

SÉRIE A, N° 295

N° D'ORDRE :

319

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Mlle Germaine AMOUREUX

INGÉNIEUR-CHIMISTE I. C. P.

ASSISTANTE A L'INSTITUT PASTEUR

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR *Bacterium tumefaciens*,
SMITH ET TOWNSEND. ÉTUDE COMPARATIVE DE DEUX
VARIÉTÉS DE POUVOIR PATHOGÈNE DIFFÉRENT.

2^e THÈSE. — LES THÉORIES MODERNES PROPOSÉES POUR EXPLIQUER LA
FERMENTATION ALCOLIQUE.

Soutenues le 13 novembre 1934 devant la Commission d'examen

MM. MOLLIARD . . . Président.
GUILLIERMOND . . . }
JAVILLIER . . . } Assesseurs.

Travail de l'Institut Pasteur. — Laboratoire de M. A. BERTHELOT.

LAVAL
IMPRIMERIE BARNÉOUD

1934



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SÉRIE A, N° 295

N° D'ORDRE :

319

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Mlle Germaine AMOUREUX

INGÉNIEUR-CHIMISTE I. C. P.

ASSISTANTE A L'INSTITUT PASTEUR

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES BIOCHIMIQUES SUR *Bacterium tumefaciens*,
SMITH ET TOWNSEND. ÉTUDE COMPARATIVE DE DEUX
VARIÉTÉS DE POUVOIR PATHOGÈNE DIFFÉRENT.

2^e THÈSE. — LES THÉORIES MODERNES PROPOSÉES POUR EXPLIQUER LA
FERMENTATION ALCOOLIQUE.

Soutenues le 13 novembre 1934 devant la Commission d'examen

MM. MOLLIARD . . . Président.

GUILLIERMOND . . . } Assesseurs.

JAVILLIER . . . }

Travail de l'Institut Pasteur. — Laboratoire de M. A. BERTHELOT.

LAVAL

IMPRIMERIE BARNÉOUD

1934

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire M. MOLLIARD.
Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

Professeurs honoraires	{	H. LE CHATELIER.	Léon BRILLOUIN.
		H. LEBESGUE.	GOURSAT.
		A. FERNBACH.	WALLERANT.
		A. LEDUC.	GUILLET.
		Émile PICARD.	PÉCHARD.
		Rémy PERRIER.	FREUNDLER.

PROFESSEURS

N.	T	Électrotechnique générale.	G. BRUHAT.....	Physique.
G. BERTRAND.....	T	Chimie biologique.	E. DARMOIS.....	Physique.
N.....	T	Physique générale.	A. DEBIERNE.....	Radioactivité.
M. CAULLERY.....	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	A. DUFOUR.....	T Physique (P. C. B.).
G. URBAIN.....	T	Chimie générale.	L. DUNOYER.....	Optique appliquée.
Émile BOREL.....	T	Calcul des probabilités et Physique mathém.	A. GUILLIERMOND.	T Botanique (P. C. B.).
N.....	T	Aviation.	M. JAVILLIER.....	Chimie biologique.
Jean PERRIN.....	T	Chimie physique.	L. JOLEAUD.....	Paléontologie.
H. ABRAHAM.....	T	Physique.	ROBERT-LÉVY.....	Zoologie.
E. CARTAN.....	T	Géométrie supérieure.	H. MOUTON.....	Chimie physique.
M. MOLLIARD.....	T	Physiologie végétale.	F. PICARD.....	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
L. LAPICQUE.....	T	Physiologie générale.	Henri VILLAT.....	T Mécanique des fluides et applications.
E. VESSIOT.....	T	Mécanique analytique et mécanique céleste.	Ch. JACOB.....	T Géologie.
A. COTTON.....	T	Physique.	P. PASCAL.....	T Chimie minérale.
J. DRACH.....	T	Analyse supérieure.	M. FRÉCHET.....	T Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
Charles FABRY....	T	Physique.	E. ESCLANGON....	T Astronomie.
Charles PÉREZ....	T	Zoologie.	M ^{me} RAMART-LUCAS	Chimie organique.
Léon BERTRAND..	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	H. BÉGHIN.....	T Mécanique physique et expérimentale.
N.....	T	Chimie organique.	FOCH.....	Mécanique expérimentale des fluides.
R. LESPIEAU.....	T	Théories chimiques.	PAUTHENIER.....	Physique (P. C. B.).
P. PORTIER.....	T	Physiologie comparée.	De BROGLIE.....	T Théories physiques.
E. RABAUD.....	T	Biologie expérimentale.	CHRÉTIEN.....	Optique appliquée.
N.....	T	Botanique.	P. JOB.....	Chimie générale.
N.....	T	Chimie appliquée.	LABROUSTE.....	Physique du Globe.
M. GUICHARD.....		Chimie minérale.	PRENANT.....	Zoologie.
Paul MONTEL.....	T	Théorie des fonctions et théorie des transformations.	VILLEY.....	Mécanique physique et expérimentale.
P. WINTREBERT..	T	Anatomie et histologie comparées.	BOHN.....	Zoologie (P. C. B.).
L. BLARINGHEM ..	T	Botanique.	COMBES.....	Sciences natur. (P. C. B.).
O. DUBOSCQ.....	T	Biologie maritime.	GARNIER.....	Calcul différentiel.
G. JULIA.....	T	Application de l'analyse à la géométrie.	PÉRÈS.....	Mécanique des fluides.
C. MAUGUIN.....	T	Minéralogie.	HACKSPILL.....	Chimie (P. C. B.).
A. MICHEL-LÉVY.		Pétrographie.	LAUGIER.....	Physiologie générale.
H. BÉNARD....	T	Mécanique expérimentale des fluides.	TOUSSAINT.....	Technique Aéronautique.
A. DENJOY.....	T	Calcul différentiel et calcul intégral.	M. CURIE.....	Physique (P. C. B.).
L. LUTAUD.....	T	Géographie physique et géologie dynamique.	G. RIBAUD.....	T Hautes températures.
Eugène BLOCH....	T	Physique théorique et physique céleste.	CHAZY.....	Mécanique rationnelle.
			GAULT.....	Chimie (P. C. B.).
			CROZE.....	Physique.
			DUPONT.....	Chimie (P. C. B.).
			LANQUINE.....	Géologie.

Secrétaire..... A. PACAUD.
Secrétaire honoraire..... D. TOMBECK.



TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	Pages 3
------------------------	------------

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DES CARACTÈRES GÉNÉRAUX DE DEUX VARIÉTÉS DE BACTERIUM TUMEFACIENS PAR LES MÉTHODES BAC- TÉRIOLOGIQUES	9
CHAPITRE PREMIER. — Caractères microscopiques	11
CHAPITRE II. — Caractères physiologiques	14
CHAPITRE III. — Caractères généraux des cultures : milieux d'origine animale ou végétale, milieux synthétiques.	20
Cultures massives	34
CHAPITRE IV. — Caractères biochimiques.	36
A. — Action sur les composés ternaires	36
B. — Action sur les composés azotés	45

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE BIOCHIMIQUE COMPARATIVE DES DEUX VARIÉTÉS DE « BACTERIUM TUMEFACIENS »	57
CHAPITRE PREMIER. — Action sur les composés ternaires	58
A. — Action sur les glucides.	58
Action sur le glucose : milieux peptoné et synthétique	58
Recherche de l'acide pyruvique	71
Recherche des produits d'oxydation	71
Action sur l'arabinose	77
Action sur le fructose.	79
Action sur le saccharose	81
Action sur l'amidon	83
G. AMOUREUX.	1

B. — Action sur les alcools plurivalents	85
<i>Action sur le glycérol.</i>	85
<i>Action sur le mannitol et le sorbitol</i>	88
C. — Action sur l'acide pyruvique	88
CHAPITRE II. — Action sur certains composés azotés. . . .	90
A. — Technique de l'étude qualitative	91
B. — Technique des déterminations quantitatives	94
C. — Action sur la peptone pancréatique de pansees	99
D. — Action sur l'acide aspartique	103
E. — Action sur l'asparagine	106
CHAPITRE III. — Etude des activités diastasiques de <i>B. tumefaciens</i>	107
CONCLUSIONS	113
BIBLIOGRAPHIE	117

INTRODUCTION

La découverte par Erwin F. SMITH [169] de *Bacterium tumefaciens*, agent pathogène du cancer des plantes, donna, à tort ou à raison, au début du xx^e siècle, l'espoir que l'étude des tumeurs malignes des plantes permettrait, par analogie, de faire avancer nos connaissances sur celles de l'homme ou des animaux. En possession de cultures pures de *Bacterium tumefaciens* on pouvait, à coup sûr, déterminer la formation de tumeurs, suivre leur développement, étudier les facteurs qui favorisent leur croissance, ou, mieux encore ceux qui, physiques, chimiques ou biologiques, retardent ou arrêtent leur évolution. Peut-être entrevoyait-on déjà la possibilité d'apprendre à lutter plus efficacement contre le cancer de l'homme. C'est probablement une des raisons pour lesquelles on s'est surtout, jusqu'ici, attaché à l'étude des tumeurs des plantes elles-mêmes, plus qu'à la physiologie de leur agent pathogène.

Dès 1877, CAVARA avait montré la nature bactérienne de la maladie en inoculant des cultures pures sur des pieds de vigne. THAXTER (1891), HALSTED (1897), SELBY (1898) [166], tour à tour, avaient également montré que la galle du Pêcher était de nature infectieuse. En 1900 TOUMEY [196] étudiait la galle de l'Amandier. Erwin SMITH, enfin, depuis 1904, s'était intéressé au problème de la formation bactérienne des tumeurs des plantes. Dès cette époque il avait reconnu dans les tumeurs de *Chrysanthemum frutescens*, l'existence de

bactéries, groupées en amas, auxquelles il était tenté d'attribuer un rôle intéressant. Ce n'est qu'en 1907 qu'il put obtenir la formation de tumeurs sur la Betterave, l'Amandier, le Pêcher, la Tomate, à l'aide de bactéries isolées de tumeurs d'Anthémis. Réciproquement des bactéries isolées de tumeurs de Betterave, par exemple, pouvaient lui servir à inoculer des Anthémis. ERWIN SMITH et C. O. TOWNSEND concluaient [183] à la non-spécificité pathogénique de l'organisme qu'ils désignaient sous le nom de *Bacillus tumefaciens* et dont ils donnaient une description sommaire mais nette.

A partir de 1911, E. SMITH publia de nombreux et intéressants travaux, seul ou avec des collaborateurs [185]. Mais, plus que l'agent pathogène, les tumeurs l'intéressaient, *Bacterium tumefaciens* étant la cause des faits qu'il étudiait, plus que le sujet de ses recherches.

Après lui, surtout à l'étranger, et tout particulièrement BLUMENTHAL, FRIEDEMANN, ISRAILKY, KAUFFMANN, LEVINE, WRIGHT, RIKER et leurs collaborateurs, se sont également occupés, moins de la biologie du microbe que de sa spécificité, de son pouvoir de provoquer des tumeurs, ou de ses propriétés sérologiques.

TREVISAN (1889) et CAVARA (1897) [61] lui avaient donné le nom de *Bacillus Ampelopsoræ*. Ce nom fut rejeté par SMITH (1911) [185] qui adopta le nom de *Bacillus tumefaciens*. Dans la littérature scientifique on le rencontre fréquemment sous le nom de *Bacterium tumefaciens* Smith et Townsend. BERGEY, en 1923 [4], indique le nom de *Phytomonas tumefaciens* Smith et Townsend, et LIESKE en 1928 [114], *Polymonas tumefaciens* (S. et T.). D'autres auteurs l'ont désigné sous le nom de *Pseudomonas tumefaciens*. Dans ce travail je lui ai conservé le nom de *Bacterium tumefaciens* (*B. tumefaciens*) parce que c'est le terme le plus fréquemment employé et surtout parce qu'il correspond aux derniers travaux de systématique bactérienne (A. R. PRÉVOT) [151].

Bacterium tumefaciens a pu être isolé, par les différents

auteurs qui l'ont recherché, soit du sol, soit directement des tumeurs des plantes. Ce n'est que par exception qu'il a été signalé comme provenant de tumeurs de souris (KAUFFMANN) [101], voire même de pus de méningites (FRIEDEMANN [83]). Il est intéressant de noter que *Bacterium tumefaciens* a pu être découvert comme étant l'agent pathogène de plantes vivant dans diverses parties du monde, et appartenant à des familles variées (*Salicaceæ* : *Salix*, *Populus* ; *Juglandaceæ* : *Juglans*, *Pterocarya*, *Carya* ; *Fagaceæ* : *Castanea* ; *Moraceæ* : *Ficus*, *Humulus* ; *Polygonaceæ* : *Rumex* ; *Chenopodeaceæ* : *Beta* ; *Caryophyllaceæ* : *Dianthus* ; *Ranunculaceæ* : *Clematis* ; *Lauraceæ* : *Persea* ; *Crucifereæ* : *Matthiola*, *Brassica*, *Raphanus* ; *Resedaceæ* : *Reseda* ; *Crassulaceæ* : *Sedum*, *Bryophyllum* ; *Rosaceæ* : *Rosa*, *Cydonia*, *Cratægus*, *Amygdalus*, *Rubus*, *Malus*, *Pyrus*, *Prunus* ; *Leguminosæ* : *Pisum*, *Trifolium*, *Medicago* ; *Geraniaceæ* : *Pelargonium* ; *Tropæolaceæ* : *Tropæolum* ; *Rutaceæ* : *Citrus* ; *Euphorbiaceæ* : *Ricinus*, *Manihot* ; *Anacardiaceæ* : *Schinus*, *Mangifera* ; *Celastraceæ* : *Euonymus* ; *Balsaminaceæ* : *Impatiens* ; *Vitaceæ* : *Vitis*, *Ampelopsis* (*Parthenocissus*) ; *Malvaceæ* : *Althæa*, *Hibiscus* ; *Sterculiaceæ* : *Sterculia* ; *Passifloraceæ* : *Passiflora* ; *Begoniaceæ* : *Begonia* ; *Cactaceæ* : *Opuntia* ; *Myrtaceæ* : *Eucalyptus* ; *Oenotheraceæ* : *Fuschia* ; *Umbellifereæ* : *Daucus*, *Pastinaca* ; *Ericaceæ* : *Vaccinium*, *Arbutus* ; *Ebenaceæ* : *Diospyros* ; *Oleaceæ* : *Forsythia*, *Ligustrum* ; *Apocynaceæ* : *Allamanda*, *Nerium* ; *Polemoniaceæ* : *Phlox* ; *Labiataæ* : *Salvia*, *Coleus* ; *Solanaceæ* : *Lycopersicum*, *Solanum*, *Nicotiana* ; *Caprifoliaceæ* : *Lonicera* ; *Compositæ* : *Chrysanthemum*, *Calendula*, *Helianthus*).

D'après DAUVERGNE et WEIL [68], les tumeurs qui doivent servir à l'isolement de *Bacterium tumefaciens* sont d'abord lavées à l'eau oxygénée, puis broyées le plus aseptiquement possible. L'ensemencement se fait abondamment sur milieux spéciaux, particulièrement sur gélose pommes de terre glucosée, sur milieu de KELLERMAN [104] ou milieu de

PATEL [144] (1). Quel que soit le milieu employé l'isolement ne se fait pas sans difficulté. La culture ne se produit pas à coup sûr. D'après Erwin F. SMITH la présence des composés libérés par la bactérie entraverait même son développement. ISRAILKY [93], ayant tout particulièrement étudié la formation du bactériophage de *Bacterium tumefaciens*, pense que c'est à la présence de cet agent lytique qu'on doit un grand nombre d'insuccès.

De plus, lorsqu'un microbe a été isolé, des difficultés d'un autre ordre surgissent avant que l'on puisse certifier que l'on se trouve en présence de *Bacterium tumefaciens* Smith et Townsend. De nombreux auteurs ont, en effet, affirmé la variabilité de *Bacterium tumefaciens*. J'indiquerai plus loin les caractères morphologiques généraux de ce microbe. Mais je veux noter ici, dès maintenant, les principales différences qui ont été signalées.

E. SMITH, lui-même [171], avait observé, à côté des formes typiques, des bactéries en Y, des formes d'invololution difficilement colorables qui se produiraient aisément sous l'action du froid, du chlorure de sodium, des acides, et que l'on rencontrerait également dans les tumeurs des plantes. Plus tard, KORINCK [105], en 1925, remarqua les mêmes formes de dégénérescence. LEVINE [112], la même année, indiquait qu'à partir d'une colonie âgée de trois mois sur gélose aux haricots on peut, par repiquages successifs sur milieu frais, obtenir des formes présentant tous les intermédiaires entre les bâtonnets et les cocci. De plus, dans beaucoup de cultures apparaîtraient des éléments ayant l'aspect de spores. PATEL, en 1927 [142], constatait l'existence de variétés pathogènes et non pathogènes. LINK et HULL [115], la même année, notaient la particulière instabilité de la bactérie, sans parler des formes lisses et rugueuses qu'ils obtenaient par culture

(1) Le milieu de KELLERMAN est un milieu pauvre en azote additionné de rouge Congo ; celui de PATEL est à base de taurocholate de soude et de cristal-violet.

sur gélose pommes de terre glucosée. Les colonies rugueuses se transforment en colonies lisses, et réciproquement, après trois jours de culture sur cette même gélose. LIESKE, enfin, en 1928 [114], croyait pouvoir décrire un cycle morphologique de *Bacterium tumefaciens*. W. H. WRIGHT, A. A. HENDRICKSON et A. J. RIKER (20), A. J. RIKER, W. M. BANFIELD, W. H. WRIGHT, G. W. KEIT et H. E. SAGEN [160] soulignaient la difficulté d'obtenir des cultures pures et indiquaient la nécessité de ne pas se contenter d'un isolement sur plaque, mais de partir d'une seule cellule. C'est dans ces conditions que l'on pourrait obtenir des cultures présentant des caractères remarquablement stables.

Certains auteurs ont été amenés à rapprocher ce microbe soit du Bacille de Friedländer (KORINCK [105]-PERLO [147]), soit de *Bacillus radiobacter* (ISRAÏLKI [95], SAGEN, WRIGHT et RIKER [162]). E. SMITH, KAUFFMANN [98] et STAPP [92] maintenaient la spécificité du groupe *Bacterium tumefaciens* composé de plusieurs espèces de bactéries. Il semble donc, d'après les diverses opinions de ces auteurs, que l'étude morphologique ou phytopathologique de la bactérie, ne pouvait guère à elle seule élucider ce problème de systématique. Pour cette raison, il a paru qu'il serait intéressant de rechercher si l'étude biochimique approfondie de deux variétés de *Bacterium tumefaciens* ne pourrait, du moins, apporter quelques arguments en faveur de l'une ou l'autre thèse.

Je dois les deux souches de *Bacterium tumefaciens* dont je me suis servie à la grande obligeance de M. J. MAGROU. La souche dénommée *Bacterium tumefaciens* H. avait été isolée de tumeurs de Houblon. Celle que je désignerai sous le nom de *Bacterium tumefaciens* Ant. provenait d'une tumeur d'Anthémis. Toutes deux déterminent la formation de lésions néoplasiques lorsqu'on les inocule à des *Pelargonium*, des Ricins ou des Betteraves. Ces plantes, suivant la variété utilisée à l'inoculation, réagissent, ou différemment, ou plus ou moins tardivement, mais sont réceptives. Au contraire, *Bac-*

terium tumefaciens H. est pathogène pour le Houblon sans l'être pour l'Anthémis, et, réciproquement, *Bacterium tumefaciens* Ant. provoque des tumeurs sur l'Anthémis, mais non sur le Houblon.

Avant d'exposer les faits qu'il m'a été donné d'observer je tiens à rendre un hommage profondément reconnaissant à la mémoire de M. le D^r Roux qui a bien voulu m'admettre à l'Institut Pasteur et à celle de M. le D^r CALMETTE pour l'indulgente bonté qu'il m'a toujours témoignée.

C'est pour moi un agréable devoir que d'exprimer ma sincère et respectueuse gratitude à M. le D^r L. MARTIN qui a bien voulu s'intéresser à mon travail et en assurer la publication.

Je tiens également à adresser mes très vifs remerciements à M. le Professeur G. BERTRAND qui m'a guidée de ses précieux conseils.

Je remercie très sincèrement M. le Professeur JAVILLIER de la bienveillante indulgence qu'il m'a témoignée et de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à mes recherches.

Je tiens aussi à remercier vivement MM. les D^{rs} MAGROU et PRÉVOT. Tous les deux m'ont prodigué de très précieuses indications et c'est à l'amabilité de M. MAGROU que je dois les deux souches microbiennes sur lesquelles a porté mon travail.

Enfin, je suis heureuse de trouver l'occasion d'exprimer toute ma gratitude à M. le D^r BERTHELOT, car, depuis qu'il m'a accueillie dans son laboratoire en 1923, et qu'il a bien voulu m'associer à ses travaux, il n'a pas cessé de me guider dans mes études et dans mes recherches.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DES CARACTÈRES GÉNÉRAUX DE DEUX VARIÉTÉS DE *BACTERIUM TUMEFACIENS*

Il peut sembler étonnant que, dans un travail intitulé « Recherches biochimiques sur *Bacterium tumefaciens* », je me sois inquiétée d'étudier les caractères morphologiques et physiologiques de cette bactérie. Puisque les auteurs qui se sont occupés d'isoler l'agent pathogène du cancer des plantes se sont trouvés en présence d'un être de forme instable et dont on ne pouvait affirmer la spécificité pathogénique, il était nécessaire de voir si les deux variétés que j'allais essayer d'identifier au point de vue biochimique, présentaient, elles aussi, des caractères particuliers. Je me suis donc efforcée, non pas seulement de vérifier les caractères généraux déjà connus de *Bacterium tumefaciens*, mais, tout particulièrement, de noter les différences ou les ressemblances morphologiques ou biologiques qui pourraient expliquer les variations biochimiques de ces deux germes, dont le pouvoir pathogène pour certaines plantes, est spécifique.

De plus, jusqu'ici, et surtout en France, la bactériologie a peu profité des résultats que la chimie pourrait lui apporter. Les bactéries sont, en général, identifiées, bien plus par leurs caractères sur les milieux usuels que par l'examen de leurs propriétés biochimiques. L'habitude en est prise. Les résultats, quoique moins précis, sont obtenus dans un temps

beaucoup plus court et avec des moyens généralement plus simples. C'est une raison importante pour ne pas négliger cette étude afin de donner aux bactériologistes les jalons dont ils ont besoin pour identifier d'une manière approximative, mais rapide, les deux variétés microbiennes que j'ai examinées.

Origines des souches étudiées.

En octobre 1931, M. J. MAGROU voulut bien me confier deux souches de *Bacterium tumefaciens*, l'une étiquetée H., l'autre Ant. et que, par simplification j'appellerai *B. tumefaciens* H. et *B. tumefaciens* Ant. Elles provenaient de son laboratoire de la Clinique chirurgicale de M. le Prof. GOSSET à la Salpêtrière et avaient été isolées l'une d'une tumeur de Houblon, l'autre d'une tumeur d'Anthémis. Depuis cette date, et après de nombreux repiquages sur gélose ordinaire et culture à 30°, ces deux variétés ont conservé la propriété de donner spécifiquement des tumeurs, l'une sur le Houblon, l'autre sur l'Anthémis. Toutes deux, inoculées à des *Pelargonium* ou des Ricins, suivant la technique que j'indiquerai plus loin, ont toujours donné des lésions néoplasiques qui commencent à être visibles vers la troisième semaine et d'une façon plus précoce pour le *B. tumefaciens* H.

CHAPITRE PREMIER

CARACTÈRES MICROSCOPIQUES

D'une manière générale, avant chaque série d'expériences, la pureté de chaque variété a été contrôlée par ensemencement sur bouillon et, après 24 heures, coloration par la méthode de Gram et la fuchsine phéniquée. De plus, après séjour plus ou moins prolongé des ballons d'expérience à la température de 30°, la pureté des cultures obtenues était, à nouveau, soigneusement vérifiée.

Forme et disposition des éléments. — Dans les préparations fixées par la chaleur et colorées par les couleurs d'aniline, cultures de 18 heures en eau peptonée (peptone pancréatique de panses à $pH = 7,5$) ou en gélose ordinaire (bouillon de bœuf peptoné à $pH = 7,5$), *B. tumefaciens* H. et *B. tumefaciens* Ant. se présentent sous forme d'éléments assez courts, aux extrémités un peu renflées. Ce sont généralement de petits bacilles ou des coccobacilles, groupés souvent en chainettes de 2 ou 3 éléments de tailles différentes, reliés par des ponts muqueux et contenus dans une même gaine. On trouve dans un même groupe des éléments presque sphériques et des éléments coccobacillaires, sensiblement plus longs et plus gros qui retiennent plus fortement la couleur. Certains sont nettement plus larges au milieu qu'aux extrémités ; d'autres, au contraire, semblent plus minces au milieu. Enfin, on en voit en forme de massues. Dans une même portion de voile microbien on trouve donc

des éléments de toutes formes et d'intensités colorantes très diverses.

Il semble qu'il y ait peu de différences entre les deux variétés. En général, pourtant, *B. tumefaciens* H. serait formé de chainettes de 2 éléments moins cocciformes, assez régulièrement colorés, et présentant fréquemment l'apparence de navettes. *B. tumefaciens* Ant., au contraire, aurait un polymorphisme plus accentué et se présenterait assez souvent sous forme de gouttelettes.

Dimensions. — Les éléments de *B. tumefaciens* H. présentent dans les cultures de 18 heures, soit en eau peptonée, soit en gélose inclinée, les dimensions suivantes : largeur : $0\ \mu\ 7$; longueur $1\ \mu\ 5$ à $2\ \mu\ 5$. Les éléments de *B. tumefaciens* Ant., dans les mêmes conditions de culture, ont comme largeur $0\ \mu\ 7$ à $0\ \mu\ 9$; leur longueur varie entre $0\ \mu\ 7$ et $2\ \mu\ 5$. Ces deux variétés présentent souvent des coccobacilles de $0\ \mu\ 7$ de longueur, groupés par deux.

Mobilité. — *Bacterium tumefaciens* est un microbe peu mobile. E. F. SMITH, N. A. BROWN et C. O. TOWNSEND [185] indiquent 3 cils polaires. GINS et LEWINTHAL, cités par KAUFMANN [103], lui attribuent de 1 à 5 (et même plus) de fouets péritriches. SAGEN, WRIGHT et RIKER [162], dans une étude comparative de *B. tumefaciens* et de *B. radiobacter* se sont intéressés à la question de la mobilité de ces bactéries et au nombre de leurs cils. Selon ces auteurs *Bacterium tumefaciens* est immobile et ne porte pas de flagelle.

J'ai constaté que les éléments de la variété H. sont pour la plupart très mobiles alors que ceux de la variété Ant. le sont beaucoup moins.

Capsules. — Après coloration par la méthode de JOHNE, *B. tumefaciens* H. et Ant., cultivés sur gélose ou en eau peptonée, se sont montrés dépourvus de capsule.

Caractères de coloration. — Les deux variétés ne prennent jamais le Gram, lorsqu'on les traite par le violet de gentiane phéniqué, par la solution iodo-iodurée et qu'on les décolore par l'alcool-acétone de M. NICOLLE. Toutes deux se colorent bien par les couleurs d'aniline mais *B. tumefaciens* Ant. présente assez souvent un espace central plus clair.

CHAPITRE II

CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES

Fermes de résistance. — J'ai déjà noté que LEVINE, en 1925 [112], indiquait la formation possible de spores dans de nombreuses cultures sur gélose de pommes de terre glucosée. Il ne me semble pas qu'aucun autre auteur ait jamais confirmé ce résultat. Pour ma part, dans les conditions d'expérience où je me suis placée (milieu, concentration en ions H, temps, température), je n'ai jamais pu déceler la présence de spore soit par examen à l'état frais, soit sur des préparations spécialement colorées.

Fermes rugueuses et lisses. — J'ai essayé d'isoler les formes rugueuse et lisse des deux variétés de *B. tumefaciens* par culture en boîtes de Pétri dans les milieux suivants : gélose ordinaire, gélose glucosée, gélose à la peptone de tourteau d'Arachide, gélose bouillon de légumes alcalin, gélose bouillon de légumes acide, gélose pommes de terre et macération de Géranium gélosée. Les colonies obtenues présentaient toujours la forme lisse. Une fois seulement et pour *Bacterium tumefaciens* Ant., la culture en gélose bouillon de légumes acide donna quelques rares colonies rugueuses qui, par repiquage sur ce même milieu, redonnèrent des colonies lisses. Ceci est d'ailleurs conforme aux résultats obtenus par LINK et HULL en 1925 [115]. Ces auteurs, en effet, avaient vu que, sur pomme de terre glucosée, les

cultures de *B. tumefaciens* donnent 50 p. 100 de colonies opaques, présentant cependant un bord lisse et transparent ; après trois jours sur gélose pomme de terre glucosée et cinq jours sur gélose bouillon de bœuf glucosé la nouvelle culture ne comporte plus que des colonies lisses avec un centre opaque encore légèrement visible. D'autre part, les repiquages successifs de gélose sur gélose favorisent la formation de colonies lisses, et les passages de bouillon en gélose le développement des colonies rugueuses (SMITH) [180]. Il semble donc qu'il s'agisse là de différences passagères dans l'aspect des cultures plutôt que de colonies appartenant à des types nettement différenciés.

Action de l'oxygène. — *Bacterium tumefaciens* H. et Ant. ont été ensemencés dans des tubes de bouillon qui ont été scellés après y avoir enlevé l'air aussi complètement que possible à l'aide de la trompe à eau. Dans ces conditions, *B. tumefaciens* H. en 24, 48 heures et 5 jours n'a donné qu'un trouble du bouillon à peine visible. *B. tumefaciens* Ant. s'est développé en très légers flocons pendant les premières 24 heures. Mais la culture était complètement arrêtée au bout de deux jours.

Action de la chaleur. — 1° *L'optimum de température* indiqué par E. SMITH, N. A. BROWN et C. O. TOWNSEND [185] pour la culture de *B. tumefaciens*, est de 28°. A cette température, et même entre 30 et 35°, le développement sur gélose inclinée est assez lent. La culture est à peine apparente après 24 heures ; mais en 48 heures, la surface du milieu se recouvre d'un enduit assez gras, transparent ; l'aspect de celui-ci est sensiblement le même pour les deux variétés. A 40°, dans les deux cas, la culture ne se produit pas.

De même, en bouillon, *B. tumefaciens* H. et Ant. donnent en 48 heures une culture nette entre 25° et 30°, plus faible

à 37°, et nulle à 40°. En eau peptonée, les deux variétés poussent moins vite qu'en bouillon, mais l'influence de la température est la même.

2° *La température mortelle* pour les deux souches de *B. tumefaciens* a été déterminée en chauffant des cultures de 36 heures en bouillon de bœuf ordinaire ($pH = 7,5$) pendant 15 minutes, à des températures différentes (50°-55° et 60°). Ces cultures étaient respectivement réensemencées en tubes de bouillon stérile que l'on abandonnait alors à l'étuve à 30°. En 24 heures, on obtenait une culture à partir des tubes de *B. tumefaciens* H. et Ant. chauffés à 50°. Mais ceux correspondant aux chauffages de 55° et 60° restaient clairs, même après 4 jours d'étuve à 30°.

E. SMITH, N. A. BROWN et C. O. TOWNSEND [185] avaient constaté que *B. tumefaciens* est tué par un chauffage de 10 minutes à 51°. ISRAILKY [93] indique que la température mortelle de cette bactérie est de 51°, mais il n'a pas noté le pH auquel cette détermination a été effectuée.

Influence de la réaction du milieu. — Pour cette étude, j'ai utilisé soit des géloses (bouillon ordinaire gélosé à 20 p. 1.000), soit de l'eau peptonée pancréatique de panse à 20 p. 1.000, amenées à des pH variant de 0,5 en 0,5 entre $pH = 4,5$ et 9. (Avec la gélose à 20 p. 1.000 il est impossible d'opérer à un pH inférieur à 5,5, car la gélose reste liquide ou semi-fluide à la température du laboratoire). Les deux variétés donnent, dans les premières 24 heures, à 30°, des cultures nettes lorsque le pH de la gélose est compris entre 6,0 et 8,5. Au-dessous de $pH = 6$, même après 48 heures à 30°, aucune culture n'apparaît dans les tubes ensemencés avec *B. tumefaciens* Ant. La variété H. donne une culture à peine visible à $pH = 5$.

En eau peptonée, après 18 heures d'étuve, on peut remarquer un début de culture dans tous les tubes dont le pH est compris entre 4,5 et 9,0, avec un maximum entre $pH = 6$

et $pH = 8$. Ce large intervalle optimum se maintient d'ailleurs après 48 heures et, entre $pH = 6$ et $pH = 8$, l'aspect des cultures est alors le même dans tous les tubes.

Naturellement ces résultats ne valent que pour les deux milieux avec lesquels j'ai expérimenté.

BECHHOLD et L. SMITH [3] indiquent que *B. tumefaciens* est peu sensible aux changements de réaction du milieu et qu'il peut se développer en bouillon entre $pH = 5,4$ et $pH = 8,2$.

Pouvoir pathogène. — I. POUVOIR PATHOGÈNE POUR LES VÉGÉTAUX. — J'ai déjà indiqué que *B. tumefaciens* pouvait être isolé des tumeurs de plantes appartenant à des familles variées. Ces mêmes plantes, inoculées avec des cultures pures de *B. tumefaciens*, peuvent former des tumeurs au point d'inoculation. Mais les lésions ne se produisent pas dans tous les cas ; il faut tenir compte de la spécificité pathogénique de la souche employée. SIEGLER [167], par exemple, possédait une souche pathogène pour *Chrysanthemum frutescens*, *Beta vulgaris* et *Bryophyllum*, mais non pathogène pour le Tabac et la Tomate, de même que *B. tumefaciens* H. ne l'est pas pour l'Anthémis.

Parfois une même souche de *B. tumefaciens* peut donner des résultats différents suivant la plante inoculée. C'est ainsi que la variété isolée du Pommier par BROWN en 1929 [56], inoculée à *Chrysanthemum frutescens* ou à *Impatiens balsamina* y produisait de nombreuses racines (« hairy-root ») et déterminait sur le Rosier de petites tumeurs ; le Haricot réagissait en donnant des tumeurs nettes sans racine ; avec *Bryophyllum* de nombreuses racines et des tumeurs sans racine se formaient : le Tabac, le Géranium et le Ricin présentaient, après un long temps d'incubation, des excroissances peu développées. Cette même variété n'était pas pathogène pour la Tomate.

Les lieux d'inoculation peuvent être variés : tiges, bourgeons, pétioles, cotylédons, racines. LEVINE [111] pense que

la taille des tumeurs dépend beaucoup plus de la région inoculée et de la vitalité de la plante que du nombre de bactéries causes de l'infection.

Toutes les tiges des plantes qui m'ont servi à obtenir des tumeurs ont été piquées dans l'entre-nœud le plus rapproché du point végétatif. Une culture de 48 heures sur gélose ordinaire était délayée aseptiquement avec un peu d'eau distillée stérile afin d'obtenir une crème assez épaisse. La pointe d'une très fine aiguille flambée, plongée dans cette bouillie microbienne, servait à introduire les bactéries dans la région sous-corticale et cambiale de l'entre-nœud. Après trois semaines environ les *Pelargonium* inoculés avec les deux variétés commençaient à présenter un léger gonflement au niveau de la piqure. Le phénomène est visible plus précocement sur les plantes inoculées avec *B. tumefaciens* H. On assiste alors à l'apparition d'une tumeur qui peu à peu grandit, se fendille, puis se dessèche. Après deux mois environ les tumeurs atteignent le volume d'une noisette. Il semble que sur *Pelargonium* les tumeurs produites par les deux souches ne sont guère différentes; celles produites par *B. tumefaciens* Ant. se dessèchent légèrement plus vite et sont un peu moins grosses (taille d'un pois); mais leur aspect général est le même.

Pendant plusieurs mois les plantes ne semblent guère souffrir de ces lésions locales; puis elles meurent un peu plus vite que les témoins, les rameaux inoculés, en général, demeurant verts plus longtemps.

II. POUVOIR PATHOGENE POUR L'HOMME ET LES ANIMAUX. — Sans vouloir entrer dans une controverse qui n'est pas du domaine de ce travail, je tiens à rappeler toute l'importance que de nombreux auteurs ont attachée à la question de savoir s'il y avait ou non quelques rapports entre les tumeurs malignes des plantes et celles des animaux, si *B. tumefaciens*, pathogène pour les plantes et découvert dans les tumeurs que

l'on rencontre spontanément dans le règne végétal pouvait, soit être isolé de néoplasmes humains ou animaux, soit, inoculé à des animaux d'expérience, reproduire des tumeurs plus ou moins semblables à celles qui se développent par inoculation de produits cancéreux. Je ne veux citer ici que les travaux de LEVINE, de KAUFFMANN [99], de FRIEDEMANN et ses collaborateurs [84], ceux de F. BLUMENTHAL, H. AULER et P. MEYER [48], de BLUMENTHAL et HIRSCHFELD [50], de B. FEIGIN, T. EPSTEIN et C. FUNK [74]. D'après ces auteurs, différentes souches de *B. tumefaciens* auraient pu être isolées d'épithéliomas greffés de la souris ou de carcinomes humains. Réciproquement, des bactéries isolées de diverses plantes détermineraient la formation de néoplasmes sur les animaux.

D'autre part, il semble d'après un travail de FRIEDEMANN, BENDIX, HASSEL et MAGNUS [81] que deux variétés isolées perdent, en devenant pathogènes pour l'homme, leur propriété de provoquer chez les végétaux l'apparition de tumeurs.

De plus, B. BORCHI et G. LUZZATTO [51], TEUTSCHLAENDER et KRONENBERGER [193] n'ont jamais obtenu la formation de néoplasmes en inoculant à des animaux, particulièrement à des rats, des cultures pures de *B. tumefaciens*.

Les deux variétés H. et Ant. que je possédais, inoculées en injections sous-cutanées à des souris, à la dose de 0 cm³ 5 de cultures totales, n'ont donné lieu à aucune formation néoplasique. De même l'injection intrapéritonéale d'une même dose de cultures totales n'a produit ni trouble ni lésion.

Enfin, il serait intéressant de savoir si, parmi les bactéries isolées par les divers auteurs qui se sont occupés de l'étude du cancer des plantes et qualifiées par eux de *B. tumefaciens*, quelques-unes ne présentent pas des différences assez importantes avec la souche *B. tumefaciens* « Smith et Townsend », pour qu'on puisse plutôt les considérer comme des espèces différentes.

CHAPITRE III

CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES CULTURES

Je me suis efforcée de noter le plus exactement possible les caractères particuliers que les deux variétés H. et Ant. pouvaient présenter sur les milieux de culture dont on se sert couramment en bactériologie. En effet, les microbiologistes attachent une importance assez grande, dans la détermination ou la classification des bactéries, à l'aspect que celles-ci peuvent présenter en bouillon, gélose, lait ou gélatine, par exemple.

Mais il a paru qu'il serait peut-être non moins intéressant de noter comment se comportait *Bacterium tumefaciens* sur des milieux préparés à l'aide de produits végétaux. Puisque ce microbe est l'agent pathogène du cancer des plantes, il semble qu'il doive être particulièrement adapté à l'assimilation des composés ternaires et azotés que celles-ci peuvent contenir, de même que la température optima à laquelle il se développe correspond aux exigences de vie de ses hôtes.

De plus, puisque les deux variétés étudiées sont pathogènes spécifiquement pour certaines plantes, on pouvait également espérer que les différences de culture pourraient être plus nettes sur ces milieux que sur ceux d'origine animale.

Enfin, une part assez importante a été faite également à l'étude des caractères de culture des deux variétés sur des milieux synthétiques, ou déjà employés pour d'autres bactéries, ou spécialement étudiés pour celles-ci. Je n'insisterai pas ici sur l'importance des milieux synthétiques en bact-

riologie. Qu'il me soit permis pourtant, de rappeler combien l'emploi de ces milieux, toutes les fois que cela est possible, permet de déterminer plus simplement les propriétés biochimiques des microbes. C'est ce que de nombreux auteurs, et notamment A. BERTHELOT, ont nettement montré à maintes reprises.

J'étudierai donc successivement les caractères généraux de culture des deux variétés :

A. Sur les milieux d'origine animale.

B. Sur les milieux d'origine végétale.

C. Sur des milieux synthétiques.

Mes déterminations de pH ont été effectuées à l'aide des indicateurs de W. M. CLARK [62] avec vérification fréquente des échelles colorées par la méthode électrométrique. Pour appliquer celle-ci, j'utilisais le grand potentiomètre de CHAUVIN et ARNOUX et, suivant les cas, l'électrode à hydrogène de HILDEBRANDT ou l'électrode à quinhydrone. Bien entendu j'employais la méthode électrométrique lorsque j'avais affaire à des milieux troubles ou colorés.

A. — MILIEUX D'ORIGINE ANIMALE

BOUILLON DE BŒUF ($pH = 7,5$). — *B. tumefaciens* H. et Ant. se développent bien en bouillon ordinaire. Leurs cultures sont pourtant d'aspect différent. En 24 heures, *B. tumefaciens* H. trouble faiblement le bouillon. Ce trouble s'accroît nettement en 48 heures ; mais dès le troisième jour, il se forme des flocons qui persistent encore après huit jours. *B. tumefaciens* Ant., au contraire, donne de larges trainées filamenteuses après 24 heures ; dès le deuxième jour, il se forme un dépôt abondant au fond du tube et le bouillon reste clair.

BOUILLON DE BŒUF GLUCOSÉ ($pH = 7,5$) ET BOUILLON MARTIN GLUCOSÉ. — Les cultures se différencient avec les mêmes caractères qu'en bouillon ordinaire. Pourtant il est à remarquer que, dans ces milieux glucosés, après trois jours à 30°, appa-

rait une collerette qui tombe très vite dans le cas de *B. tumefaciens* Ant., et se maintient jusqu'au cinquième jour puis tombe vers le huitième jour dans le cas de la variété H.

EAU PEPTONÉE (peptone pancréatique de panses 20 p. 1.000) ($pH = 7,5$). — On retrouve les mêmes différences : pour *B. tumefaciens* H., tendance à former une collerette importante ; les cultures de *B. tumefaciens* Ant. sont moins troubles et présentent, au contraire, un dépôt filamenteux.

EAU PEPTONÉE GLUCOSÉE (peptone pancréatique de panses 20 p. 1.000 ; glucose 20 p. 1.000) ($pH = 7,5$). — Les cultures, sur ce milieu, présentent les mêmes caractères qu'en bouillon glucosé mais apparaissent plus tardivement.

GÉLOSE ORDINAIRE ($pH = 7,3$). — Sur gélose inclinée, les deux variétés donnent des cultures peu abondantes après un séjour de 24 heures à 30°. Le milieu, après 48 heures, se recouvre d'un enduit gras abondant qui se colore en jaune brun après 15 jours environ.

Par piqûre, la culture se limite presque exclusivement à la surface de la gélose sous forme d'un enduit jaunâtre. En boîtes de Petri, les deux variétés présentent des colonies rondes, grasses, peu surélevées, toutes semblables.

GÉLOSE GLUCOSÉE. — Sur gélose inclinée glucosée (glucose 20 p. 1.000), la culture est très lente pendant les premiers jours. Après une semaine environ, le milieu est recouvert d'un enduit jaunâtre semblable à celui observé sur gélose ordinaire.

GÉLOSE NITRATÉE GLUCOSÉE. — Sur ce milieu *B. tumefaciens* H. et Ant. ne donnent pas de culture, même après huit jours à 30°.

GÉLOSE LACTOSÉE. — Après 48 heures de séjour à 30° la gélose est recouverte d'un enduit gras légèrement jaunâtre.

GÉLOSE LACTOSÉE TOURNESOLÉE. — En 48 heures à 30°, *B. tumefaciens* H. et Ant. bleussent la gélose lactosée tournesolée ensemencée en boîtes de Petri.

LAIT. — *B. tumefaciens* H. et Ant. donnent une culture sur lait, mais ne le font pas coaguler. En cinq jours, le pH passe de 5,5 à 6,2. Après trois semaines de séjour à 30°, le lait est devenu uniformément ocre.

La variété dont s'était servie E. SMITH, N. A. BROWN et C. O. TOWNSEND [185], dans leur étude sur *B. tumefaciens*, possédait la propriété de coaguler le lait. KALANTARIAN [97], puis ISRAILKY [93] avaient, au contraire, isolé plusieurs souches sans action coagulante.

LAIT TOURNESOLÉ. — Dès les premières 24 heures, le lait tournesolé est lilas bleuâtre. L'alcalinisation se poursuit, légèrement plus vite pour *B. tumefaciens* H., et vers le cinquième jour les tubes sont entièrement bleus. Ceci est un caractère qui différencie le groupe de *B. tumefaciens* du groupe de *B. radiobacter*.

GÉLATINE ORDINAIRE. — Ensemencées par piqûre dans des tubes de gélatine à 20 p. 1.000 (pH = 6,8), les deux variétés H. et Ant. se développent le long de la piqûre, plus abondamment à la surface qu'à la base ; mais même après un mois de culture à la température du laboratoire, aucune des deux souches ne liquéfie le milieu. Tous les auteurs sont d'ailleurs d'accord sur ce point (CAVARA [61], SMITH [180], BROOKES, NAIN et RHODES [55], par exemple).

GÉLOSE ASCITE. — Sur gélose ascite, *B. tumefaciens* H. et Ant. envahissent toute la surface du milieu dès les premières 24 heures, en donnant une culture grasse et abondante.

SÉRUM COAGULÉ. — En sérum coagulé, les deux variétés donnent, après 48 heures de séjour à 30°, des cultures mai-

gres et sèches qui ne sont pas plus importantes après huit jours.

MILIEU A L'ŒUF DE BESREDKA [59]. — *B. tumefaciens* H. et Ant. y déterminent une coagulation partielle qui débute par l'apparition de filaments, puis de flocons se développant dans toute la hauteur des tubes. A la surface, on observe, après 48 heures, une légère collerette, plus nette dans les tubes ensemencés avec *B. tumefaciens* H. Après huit jours il s'est produit une légère acidification et passage du pH de 6,8 à 6,4.

GÉLOSE AU BLANC D'ŒUF DE ROUBLLOT. — Sur cette gélose on obtient des cultures grasses, blanches, presque transparentes, dès le deuxième jour; ce caractère est surtout marqué pour *B. tumefaciens* H.

B. — MILIEUX D'ORIGINE VÉGÉTALE

EAU PEPTONÉE ARACHIDE (hydrolyse pepsique de farine de tourteaux d'Arachide) (pH = 7,3) [16]. — Cette eau peptonée a été obtenue suivant les indications données par A. BERTHELOT, G. AMOUREUX et D. PETIT [24], c'est-à-dire en hydrolysant pendant 7 heures, par la pepsine en milieu chlorhydrique, de la farine de tourteaux d'Arachide. Sur ce milieu, en 24 heures, *B. tumefaciens* H. donne un trouble faible, de même qu'en bouillon ordinaire et en eau peptonée pancréatique. Après trois jours il y a formation d'une collerette. Avec cette peptone, *B. tumefaciens* H. se différencie encore très nettement de la variété Ant. qui donne rapidement des cultures d'aspect glaireux. Vers le troisième jour, il se forme des flocons dans le milieu; puis l'eau peptonée s'éclaircit, alors qu'après huit jours elle est encore trouble si elle a été ensemencée avec *B. tumefaciens* H.

GÉLOSE A LA PEPTONE D'ARACHIDE (eau peptonée Arachide ($pH = 7,3$) additionnée de 20 p. 1.000 de gélose). — A la surface de la gélose Arachide, on obtient en 48 heures, comme en gélose ordinaire, et pour les deux souches de *B. tumefaciens*, un enduit blanchâtre abondant, très gras pour *B. tumefaciens* H., plus sec pour la variété Ant.

GÉLOSE GLUCOSÉE A LA PEPTONE D'ARACHIDE (glucose 20 p. 1.000 ; $pH = 7,3$). — Sur cette gélose, les deux souches se différencient assez nettement l'une de l'autre. *B. tumefaciens* H. donne, comme sur gélose ordinaire, un enduit gras, épais, devenant jaune-brun vers le cinquième jour. Avec *B. tumefaciens* Ant., on observe, au contraire, au bout de 24 heures, une culture assez sèche qui ne se transforme qu'au cinquième jour en un enduit gras, épais, mais grisâtre, avec dépôt jaune dans le fond du tube.

Il est à remarquer, de plus, que, sur cette gélose Arachide glucosée, les cultures sont beaucoup plus abondantes que sur gélose ordinaire.

EAU PEPTONÉE SOYA ($pH = 7,5$). — Encouragée par les résultats obtenus avec la peptone de tourteaux d'Arachide, je me suis servie d'une peptone pepsique de tourteaux de Soya plus riche encore que la précédente en substances protéiques [25].

En eau peptonée de Soya, la culture est à peine visible après 24 heures à 30° ; mais, au quatrième jour, les tubesensemencés avec *B. tumefaciens* H. et surtout *B. tumefaciens* Ant. présentent une collerette importante et un trouble très marqué.

GÉLOSE A LA PEPTONE DE SOYA (eau peptonée Soya ($pH = 7,5$) additionnée de 20 p. 1.000 de gélose). — Après 24 heures de séjour à 30°, les deux variétés donnent des cultures analogues à celles que l'on obtient en gélose ordinaire. Mais

après quatre jours, *B. tumefaciens* Ant. donne une culture grasse beaucoup plus abondante que celle de *B. tumefaciens* H.

POMME DE TERRE. — Sur pomme de terre *B. tumefaciens* H. donne un enduit apparent au bout de 48 heures, d'abord jaunâtre, puis jaune-brun dès le cinquième jour. Les pommes de terre ensemencées avec *B. tumefaciens* Ant. se recouvrent dès le deuxième jour, d'un enduit blanchâtre assez important. La culture brunit à peine, et, après huit jours à 30°, a conservé une coloration jaune.

POMME DE TERRE BILIÉE. — Les pommes de terre biliées préparées suivant la technique de A. CALMETTE et C. GUÉRIN [59] et ensemencées avec les deux variétés, se recouvrent en huit jours d'un enduit verdâtre, plus sec avec *B. tumefaciens* Ant. Dans les deux cas il ne se forme pas de voile à la surface du liquide. Après un mois, seule, la variété H. présente une collerette importante.

CAROTTE. — La carotte ne convient pas à la culture de *B. tumefaciens*. Ensemencés avec *B. tumefaciens* H., des tubes de carotte contenant de l'eau de condensation ne donnent une maigre culture que dans le liquide. Les tubes ensemencés avec la variété Ant. restent complètement stériles.

NAVET et CÉLERI-RAVE. — *B. tumefaciens* H. et Ant. ensemencés sur navet ou sur céleri-rave n'ont pas donné de culture après huit jours à 30°.

BETTERAVE. — Etant donné le développement facile des tumeurs sur la betterave, j'ai pensé qu'il serait intéressant d'essayer de cultiver les deux souches sur du jus de betterave. Celui-ci était préparé de la façon suivante : des betteraves rouges, lavées, épluchées et râpées étaient mises à bouillir une demi-heure avec leur poids d'eau distillée en

maintenant le volume constant. Le liquide refroidi, exprimé au moyen d'une toile, était stérilisé par trois chauffages d'une heure à 100°, à 24 heures d'intervalle. Cette même solution gélosée (20 p. 1.000) était également stérilisée par trois chauffages à 100°.

Sur ces deux milieux *B. tumefaciens* H. et Ant. se différencient très nettement. En milieu liquide la variété Ant. m'a toujours donné, après huit jours d'incubation à 30°, une culture nette se présentant sous l'aspect d'un voile gras, très épais et grimpant, qui, après un mois, était tombé au fond du tube. Sur gélose, on obtenait en huit jours un enduit gras, épais, jaunâtre.

La variété H., au contraire, même après un mois de séjour à 30° n'a jamais donné la moindre trace de culture sur ces deux milieux à la Betterave.

GÉLOSE AUX HARICOTS. — Sur gélose-haricots, *B. tumefaciens* H. donne en 48 heures une culture grasse très abondante. La variété Ant. ne donne, même en huit jours, qu'une culture beaucoup plus maigre.

GÉLOSE AUX CROSNES. — J'ai profité de recherches en cours avec A. BERTHELOT et F. van DEINSE [26] sur l'emploi des macérations de crosnes comme milieu de culture, pour essayer le bouillon obtenu avec ces rhizomes. Ce milieu gélosé à 20 p. 1.000 ($pH = 6,2$) donne avec les deux variétés H. et Ant., en 48 heures, un enduit épais, gris foncé, qui, au bout d'un mois, est beaucoup plus coloré avec *B. tumefaciens* H.

GÉLOSE AU MALT (extrait de malt pâteux : 125 grammes par litre ; gélose 20 p. 1.000). — Sur ce milieu je n'ai jamais pu obtenir de culture à 30°, soit avec *B. tumefaciens* H., soit avec *B. tumefaciens* Ant.

GÉLOSE BOUILLON DE LÉGUMES (préparée suivant la technique indiquée par A. BERTHELOT) [11] (pH naturel = 6,5). — Sur

gélose au bouillon de légumes les deux variétés forment, en 48 heures à 30°, un enduit gras assez important.

GÉLOSE BOUILLON DE LÉGUMES ALCALIN ($pH = 7,3$). — Sur la même gélose amenée à $pH = 7,8$, *B. tumefaciens* H. et Ant. donnent également une culture grasse bien nette.

GÉLOSE AU BOUILLON DE GÉRANIUM. — Le bouillon de Géranium (*Pelargonium zonale*) qui a servi à préparer cette gélose avait été obtenu en faisant macérer à froid, puis à l'ébullition, 100 grammes de Géranium haché (feuilles, pétioles et petites tiges) dans un litre d'eau de conduite. Après filtration sur toile et addition de 20 p. 1.000 de gélose, ce milieu, stérilisé à 115° pendant 20 minutes, contrairement à ce que l'on pouvait espérer, n'a permis la culture d'aucune des deux variétés; et pourtant *B. tumefaciens* H. et Ant. sont capables, dans des conditions favorables, d'utiliser les composés contenus dans les tiges et feuilles de *Pelargonium* puisqu'ils forment des tumeurs à leurs dépens.

MILIEU CENDRES DE GÉRANIUM + FRAGMENTS DE PLANTES (Betterave, Oignon, Courge, Poireau, Anthémis, Géranium). — Possédant un milieu semi-synthétique convenant particulièrement bien à la culture de *B. tumefaciens* (milieu que j'indiquerai plus loin), j'ai essayé de déterminer si l'introduction de fragments de diverses plantes pourrait apporter des éléments capables de changer l'aspect des cultures. A ce milieu, et dans des tubes différents, j'ai donc ajouté respectivement des morceaux de Courge, de racine de Betterave, de bulbe d'Oignon, de tiges et feuilles de Géranium, d'Anthémis et de Poireau.

Seuls les tubes contenant des tiges et feuilles de Géranium n'ont présenté aucune culture après ensemencements respectifs avec les deux variétés et séjour d'un mois à la température de 30°. Ceci confirme les résultats obtenus avec la macération de Géranium. *B. tumefaciens* Ant. donne en pré-

sence d'Anthémis une culture particulièrement importante, qui se présente, après huit jours, sous l'aspect d'un voile blanc rosé, épais et plissé. (Après un mois, le premier voile étant tombé au fond du tube, un second s'était formé, également très épais, et coloré en jaune-rosé). *B. tumefaciens* H., sur ce milieu ne se différencie sensiblement pas des cultures en liquide non additionné de fragments d'Anthémis et présente d'abord un voile blanc jaunâtre, bientôt remplacé par un second voile de couleur blanche.

L'introduction de fragments d'Oignon, de Courge, de Betterave et de Poireau ne change sensiblement pas l'aspect des cultures des deux variétés; *B. tumefaciens* H. donne un voile blanc et lisse à la surface du liquide; *B. tumefaciens* Ant. fournit un voile épais et plissé, de coloration souvent un peu rosée. On peut noter cependant que l'Oignon favorise légèrement la culture des deux variétés.

G. — MILIEUX SYNTHÉTIQUES

1. MILIEU SEMI-SYNTHÉTIQUE AUX CENDRES DE PELARGONIUM. — En 1930, A. BERTHELOT [15] a donné la formule d'un milieu artificiel convenant particulièrement à la culture de *B. tumefaciens*. Les acides fournis à la bactérie étaient neutralisés, non par une solution de soude, de potasse ou d'ammoniaque, mais par des cendres obtenues en calcinant au rouge sombre des feuilles et tiges de Pelargonium. Les éléments minéraux que *B. tumefaciens* rencontre dans les tissus de la plante au moment de la formation des tumeurs étaient donc introduits à des doses excessivement faibles, mais quand même suffisantes pour favoriser le développement du germe. La préparation de ce milieu semi-synthétique ayant été bien précisée par A. BERTHELOT, j'indiquerai simplement les résultats obtenus avec les deux variétés H. et Ant.

Dès le troisième jour de culture à 30°, comme dans les cultures en bouillon ou eau peptonée, la variété H. trouble

uniformément le milieu qui reste clair lorsqu'il est ensemencé avec la souche Ant. Mais, dans les deux cas, un voile épais apparaît après huit jours environ, lisse et blanc avec *B. tumefaciens* H., un peu brunâtre et plissé avec *B. tumefaciens* Ant.

2. MILIEUX A BASE D'ACIDE PYRUVIQUE. — A. BERTHELOT [13] ayant remarqué l'action favorisante de l'acide pyruvique ou du pyruvate de sodium sur le développement des bactéries, j'ai préparé des milieux où l'acide pyruvique est, soit seule source de carbone, soit associé à du glucose ou du glycérol.

a. Milieu simple.

Eau de conduite	1.000 g.
PO ⁴ HK ²	3
SO ⁴ Mg crist.	4
CH ³ — CO — COOH.	5

Cette solution a été amenée à $pH = 7,3$ avec de l'ammoniaque diluée. Après filtration sur filtre Laurent et stérilisation, le pH se maintient à $pH = 7$.

Ce milieu très simple permet en 24 heures d'obtenir des cultures nettes. Les deux microbes troublent uniformément le liquide. Après huit jours à 30°, le pH est passé de 7,0 à 7,7.

b. Milieu glucosé. — Le même milieu a été additionné de glucose R. A. L. (2 p. 100) avant ajustage à $pH = 7,3$. *B. tumefaciens* Ant. s'y différencie de la variété H. en donnant une culture floconneuse, qui tend dès le troisième jour, à grimper le long des parois du tube. Après huit jours à 30° le pH est le même et égal à 7,5-7,6 ; il y a donc eu légère alcalinisation.

c. Milieu glycérolé (milieu pyruvique simple additionné de 50 p. 1.000 de glycérol avant stérilisation). — Comme le glucose, le glycérol favorise le développement de flocons abondants qui apparaissent après deux jours de culture à 30° dans les tubes ensemencés avec *B. tumefaciens* Ant. La

variété H., au contraire, trouble faiblement ce même milieu. L'alcalinisation produite en huit jours est à peine notable.

3. MILIEU COMPLEXE AUX ACIDES :

Eau distillée	1.000 g.
Acide pyruvique	1 g.
Ac. sulfurique N/4	7 cm ³ 5
Ac. ortho-phosphorique à 60°	0 cm ³ 75
Ac. malique sec.	1 g.
Ac. tartrique	1 g.
Ac. citrique.	0 g. 5
Ac. glutamique	0 g. 1
Ac. azotique à 36°.	0 cm ³ 25
Arabinose	2 g.
Glucose	3 g.
Asparagine.	0 g. 1
Solution oligodynamique.	1 cm ³
Carbonate de magnésium léger. . . .	0 g. 5
Carbonate de sodium sec.	0 g. 1
Carbonate de potassium sec.	2 g.

La solution obtenue, de pH inférieur à 3, est amenée à pH = 7 avec de l'ammoniaque diluée; après stérilisation par chauffage à 115° pendant 20 minutes, le pH se maintient à 6,8 ou 6,9.

La solution oligodynamique proposée par A. BERTHELOT [18] permettait d'introduire, à l'état de traces, les plus importants des infiniment petits chimiques dont M. le Prof. G. BERTRAND et ses élèves ont montré l'importance considérable dans le développement de tout être vivant.

Elle répondait à la composition suivante :

(SO ⁴) ³ Fe ²	50 g.
SO ⁴ Mn, 5 H ² O	2
SO ⁴ Ca, 2 H ² O	0,50
Cl ² Ni, 6 H ² O	0,05
Cl ² Co, 6 H ² O	0,05
(SO ⁴) ² Ti ²	0,20
SO ⁴ Zn, 7 H ² O	0,10
SO ⁴ Cu, 5 H ² O	0,05
SO ⁴ Gl, 4 H ² O	0,10
BO ³ H ³	0,05
SO ⁴ H ² (à 66° B ^e)	1 cm ³
Eau distillée	1.000

Cette solution était introduite à la dose de 1 cm³ par litre de milieu.

Après cinq jours à 30°, *B. tumefaciens* Ant. présente un voile assez fin, plissé, et couvrant toute la surface du liquide. Les ballons ensemencés avec la variété H. contiennent des voiles plus épais, déjà bosselés et tombants. Après un mois, tous les voiles se sont déposés mais le milieu correspondant à la variété H., seul, reste trouble.

MILIEU T. M. ($pH = 6$) (1). — Ce milieu a été spécialement préparé pour étudier l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les glucides.

Eau distillée	4.000 g.
PO ⁴ H ² K	5
SO ⁴ Mg crist	2,5
SO ⁴ (NH ⁴) ²	2
SO ⁴ Fe. SO ⁴ (NH ⁴) ² , 6 H ² O	0,05

La solution ainsi obtenue a été amenée à $pH = 6$ avec de l'ammoniaque diluée, répartie en tubes de verre vert, puis stérilisée par chauffage de 20 minutes à 115°. Le glucide nécessaire à la culture du microbe était stérilisé séparément et introduit aseptiquement dans le milieu.

Lorsque la faible solubilité du glucide ne permettait pas d'en faire une solution à 20 p. 100, j'en préparais une solution à 2 p. 100 dans laquelle j'introduisais, après stérilisation, XX gouttes pour 10 cm³ d'une solution concentrée et stérile des éléments du milieu T. M. Elle correspondait à la composition suivante :

Eau distillée.	4.000 g.
PO ⁴ H ² K	50
SO ⁴ Mg crist	25
SO ⁴ (NH ⁴) ²	20
SO ⁴ Fe, SO ⁴ (NH ⁴) ² , 6 H ² O	0,5

Cette solution était amenée à $pH = 6$ avec de l'ammoniaque diluée.

Les résultats obtenus seront indiqués plus loin.

(1) *Remarque.* — J'ai pensé qu'il était plus simple d'indiquer ici la composition des milieux synthétiques qui m'ont respectivement servi à déterminer les propriétés biochimiques de *B. tumefaciens* H. et Ant. Je noterai donc à ce chapitre les techniques employées plus que les résultats obtenus.

4. MILIEU « A. M. C. ». — Ce milieu a été étudié particulièrement par A. BERTHELOT [13 b] et utilisé par Mlle E. OSSART [140] pour déterminer les propriétés biochimiques de deux microbes acétonogènes. Il m'a servi occasionnellement à rechercher la formation d'acétylméthylcarbinol aux dépens de l'acide pyruvique.

Eau distillée.	1.000 g.
PO ⁴ HK ²	1,75
NO ³ K.	1
SO ⁴ Mg crist.	0,5
SO ⁴ (NH ⁴) ²	1
Cl ² Ca.	0,05

La solution obtenue est à $pH = 7,6$; elle est ramenée à la neutralité par addition d'une solution de phosphate monopotassique à 40 p. 100; puis, après stérilisation par chauffage de 20 minutes à 120°, elle est additionnée de 2 p. 100 de pyruvate de sodium, sous forme d'une solution à 25 p. 100 filtrée sur bougie L5.

Ce milieu est très favorable à la culture de *B. tumefaciens*. Dès les premiers jours, les deux variétés H. et Ant. troublent uniformément le liquide qui se recouvre ensuite de voiles épais, ne se détachant de la surface que lentement.

5. MILIEU « S-G ». — La solution A correspondant à la composition suivante :

Eau distillée	1.000 g.
SO ⁴ H ² N/4	7 cm ³ 5
PO ⁴ H ³ (à 60° B ^é)	3 cm ³
CO ² Mg	0 g. 25
CO ² K ²	1 g. 5

était amenée à $pH = 7,5$ avec de l'ammoniaque diluée et stérilisée par chauffage à 115° pendant 20 minutes.

Une deuxième solution B, solution de glucose à 50 p. 100 en poids, était, après stérilisation à 110° pendant 20 minutes, ajoutée à A, stérilement, et en quantité suffisante pour obtenir une solution contenant 30 p. 1.000 de glucide. Enfin une solution tampon C, contenant 19 g. 94 de PO⁴HNa², 2H²O et 2 g. 9 de PO⁴H²K dissous dans l'eau distillée, amenée à 100 centimètres cubes et à $pH = 7,5$, puis stérilisée 20 minutes à 115°, était introduite à la dose de 4 cm³ 4 pour 100 centimètres cubes de liquide; elle permettait d'obtenir un milieu à $pH = 7,5$ fortement tamponné, puisqu'il contenait environ 17 g. 5 de phosphates par litre.

Cette solution nutritive convient au développement des deux souches de *B. tumefaciens*. Les deux variétés s'y développent en gardant leurs caractères habituels et respectifs. Après trois semaines à 30° toutes les cultures ont pris une teinte brune assez foncée.

D'autres milieux analogues ont été obtenus en remplaçant le glucose, soit par 30 p. 1.000 de saccharose, soit par 50 p. 1.000 de glycérol. Dans tous les cas, les cultures étaient abondantes même en cinq jours à 30°; après trois semaines, tous les milieux avaient pris une coloration brune très nette, légèrement plus faible cependant pour ceux additionnés de glycérol.

Ce sont ces milieux qui ont été employés dans l'étude de l'attaque du saccharose et du glycérol par *B. tumefaciens* H. et Ant.

D. — CULTURES MASSIVES

En me servant des boîtes de M. NICOLLE et ALLILAIRE [138], j'ai pu obtenir des quantités de corps microbiens assez importantes pour pouvoir comparer aisément les deux variétés H. et Ant. Comme milieu j'employais soit la gélose peptone pancréatique de panse, soit la gélose Arachide, toutes deux à pH = 7,5 et gélosées à 30 p. 1.000.

ASPECT. — Les cultures de 48 heures sont très abondantes. Chaque boîte est recouverte d'un enduit gras, très épais et visqueux sur gélose-arachide, moins épais et moins visqueux sur gélose-panse. Avec *B. tumefaciens* H., le milieu Arachide se recouvre d'un enduit très glaireux. La couche inférieure de celui-ci, en contact immédiat avec la gélose, était de teinte rosée, mais son épaisseur était très faible. Au contraire, la zone supérieure, plus importante, était blanc jaunâtre. *B. tumefaciens* Ant., sur le même milieu, donne un enduit grisâtre plus épais et moins visqueux. L'aspect des cultures des deux variétés est donc nettement différent.

ODEUR. — Les masses microbiennes provenant de la gélose-Arachide possèdent une odeur particulièrement désagréable et nettement différente de celle des cultures sur gélose-p. pancréatique de panses. L'odeur de la variété Ant. est plus accusée que celle de la variété H.

POIDS. — La peptone d'Arachide a permis d'obtenir, par boîte de Nicolle, un rendement moyen de 23 grammes avec *B. tumefaciens* H. et de 25 grammes avec la variété Ant. Ces chiffres sont de beaucoup supérieurs à ceux que l'on obtient avec la gélose peptone pancréatique de panses dont le poids moyen de la récolte n'est que de 4 grammes par boîte. Cette différence peut être expliquée en partie par une abondance plus grande de mucilage lorsque les deux variétés sont cultivées sur milieu Arachide. Mais la détermination de l'extrait, en rapport avec la teneur en eau des corps microbiens, montre que le rendement brut en poids sec est réellement supérieur lorsqu'on emploie le milieu végétal gélosé.

EXTRAIT SEC. — En effet, voici les valeurs des extraits secs des deux variétés cultivées sur gélose Arachide et gélose peptone pancréatique de panses ; on peut en déduire approximativement les poids de corps microbiens secs obtenus par boîte.

Variété microbienne	Milieu d'origine animale		Milieu d'origine végétale	
	Extrait sec p. 100	Extrait sec par boîte	Extrait sec p. 100	Extrait sec par boîte
H.	22,5	0,90	8,8	2,02
Ant.	22,8	0,91	9,6	2,40

CHAPITRE IV

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES

Ce chapitre sur les caractères biochimiques des cultures de *B. tumefaciens* en eau peptonée ou milieu synthétique ne comprend nullement l'étude, même qualitative, des produits formés dans ces milieux. Jusqu'ici, il me semble, les travaux parus sur *B. tumefaciens* ont été publiés plus par des bactériologistes que par des chimistes. Il m'a donc semblé important, au moins pour garder des points de repère avec les travaux antérieurs, et surtout pour rester plus en contact avec les méthodes bactériologiques actuelles, d'indiquer dans un premier chapitre, l'aspect de ces cultures, la réaction des milieux, parfois même une détermination chimique très courante dans la technique bactériologique, me réservant d'étudier dans d'autres chapitres, soit qualitativement, soit quantitativement le chimisme des deux souches de *B. tumefaciens*.

A. — ACTION SUR LES COMPOSÉS TERNAIRES

1° ACTION SUR LES GLUCIDES ET LES GOMMES

Je me suis servie d'une eau peptonée (peptone pancréatique de panse 20 p. 1.000) amenée à $pH = 7,5$ avec de la soude diluée, filtrée sur « carton-mou » Durieux et stérilisée en tubes de verre vert par un chauffage d'une demi-heure à 120° .

Pour éviter l'action de la peptone sur le glucide, tout particulièrement pendant la stérilisation, les sucres ont été stérilisés séparément par chauffage à 110° pendant 20 minutes

en tubes Pyrex. Lorsque la solubilité du glucide était assez grande, et c'était le cas le plus général, j'en faisais une solution à 20 p. 100 que j'introduisais à la dose de XX gouttes pour 10 centimètres cubes d'eau peptonée, afin d'obtenir un milieu contenant 2 p. 100 de glucide. Lorsqu'il s'agissait d'un produit de prix élevé, ou lorsque la solubilité de celui-ci était faible, j'en préparais au contraire une solution stérile à 2 p. 100 que j'additionnais, après stérilisation, d'une eau peptonée concentrée, également stérile, et à $pH = 7,5$.

Le milieu synthétique employé était le milieu T. M. dont la composition a déjà été indiquée (p. 32).

a) *Action sur les oses et holosides* (présents dans le milieu à la concentration de 2 p. 100). — E. SMITH [177], puis ISRAILKY [94] ont noté, il y a longtemps déjà, que *B. tumefaciens* produit peu d'acides aux dépens des glucides. Effectivement, en milieu peptoné, c'est-à-dire dans un milieu riche en substances azotées, la réaction terminale de la culture est alcaline ; mais la forte production de substances basiques masque peut-être la formation d'acides provenant de la fermentation du glucose ainsi que A. BERTHELOT [9], puis F. G. VALLE-MIRANDA [197] l'ont montré pour *Proteus vulgaris*. Les résultats obtenus dans ce travail montrent, qu'en milieu synthétique, au contraire, la réaction finale est toujours très nettement acide.

RIKER, BANFIELD, WRIGHT, KEIT et SAGEN [160] ont étudié la fermentation des glucides en milieu synthétique spécial, au glycérophosphate, mais avec l'intention particulière de comparer *B. tumefaciens* avec les microbes du groupe de *B. radiobacter* et de *B. radicicola*.

En milieu peptoné, *B. tumefaciens* H. et Ant. se différencient par l'aspect des cultures obtenues en présence de glucides. Après quatre jours à 30°, la variété Ant. s'est déjà développée dans tous les tubes ; un voile tend à se former à la surface de la plupart du liquide. Tous les milieux ense-

mencés avec la variété H. présentent un louche uniforme et peu ou pas de voile. Mais il est à remarquer que, pour ces deux souches, ce sont les mêmes oses et holosides, particulièrement le glucose, le fructose, le galactose, le mannose, le saccharose et le lactose, qui donnent les cultures les plus abondantes.

A 30°, déjà en quatre jours, mais surtout en dix jours, *B. tumefaciens* Ant. alcalinise l'eau peptonée additionnée de presque tous les oses et holosides que j'ai pu étudier. Le pH est particulièrement alcalin avec le rhamnose, le sorbose et le raffinose. Seuls, les milieux à l'arabinose et au xylose s'acidifient très légèrement pendant les premiers jours ; mais au dixième jour, les cultures ont repris leur pH primitif.

B. tumefaciens H., dans ces mêmes conditions, acidifie faiblement l'eau peptonée additionnée de glucose, de saccharose, de lactose et de maltose. En présence de xylose et de mannose, l'acidification est plus nette et surtout plus durable. Enfin, les milieux au rhamnose deviennent alcalins lorsqu'ils sont ensemencés indifféremment avec les variétés H. et Ant.

Valeurs des pH obtenus en milieu peptoné.

Glucide	pH du témoin	pH après 4 jours à 30°		pH après 10 jours à 30°	
		H.	Ant.	H.	Ant.
Arabinose .	7,1	6,9	6,8	7,5	7,2
Xylose . . .	7,2	6,9	6,8	6,2	7,1
Rhamnose .	7,2	7,2	7,3	7,6	8,0
Sorbose . .	7,3	7,2	7,6	7,5	8,0
Fructose . .	7,3	7,0	7,0	6,4	7,3
Glucose . .	7,3	7,2	7,2	6,5	7,3
Mannose . .	7,3	7,4	7,5	6,2	7,6
Galactose .	7,3	7,2	7,1	6,9	7,6
Maltose . .	7,3	7,2	7,2	6,7	7,5
Lactose . .	7,3	7,2	7,5	7,0	7,5
Saccharose .	7,4	7,2	7,2	6,6	7,6
Raffinose. .	7,4	7,3	7,6	7,7	7,9

En milieu synthétique, tous les oses et holosides ont permis d'obtenir des cultures nettes en 18 heures, avec formation de voiles après 8 jours de culture à 30°.

Déjà en huit jours, mais surtout après quinze jours ou même trois semaines, les deux variétés acidifient fortement ces milieux. Avec tous les glucides étudiés (arabinose, xylose, fructose, glucose, mannose, saccharose), le *pH* passe rapidement de 6 à 4,8 ou 4,5. Cette acidification est très rapidement obtenue avec les milieux additionnés d'arabinose, particulièrement ceuxensemencés avec la variété H.

Valeurs des pH obtenus en milieu synthétique.

Glucide	<i>pH</i> du témoin	<i>pH</i> après 8 jours		<i>pH</i> après 15 jours		<i>pH</i> après 3 sem.	
		H.	Ant.	H.	Ant.	H.	Ant.
Arabinose.	6,0	4,7	5,2	4,5	5,0	4,5	4,8
Xylose . .	6,0	5,4	5,8	4,7	4,7	4,5	4,7
Fructose .	6,0	5,2	5,7	4,8	5,0	4,7	4,8
Glucose. .	6,0	5,5	5,7	4,7	4,8	4,7	4,7
Mannose .	6,0	5,0	5,5	4,7	4,7	4,7	4,5
Saccharose	6,0	5,0	5,4	4,8	5,0	4,8	4,8

b) *Action sur l'amidon et l'inuline.* — Pour étudier qualitativement l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les polyholosides, je me suis bornée, comme ci-dessus, à noter l'aspect des cultures et la réaction des milieux, à des intervalles de temps différents, en eau peptonée pancréatique de panses (*pH* = 7,5) additionnée d'amidon ou d'inuline.

En eau peptonée à 30°, avec les deux variétés H. et Ant. et pour les polysides étudiés, il y a alcalinisation du milieu, déjà en quatre jours et plus fortement après dix jours de culture. L'alcalinisation est plus nette avec *B. tumefaciens* Ant., cette variété se développant d'ailleurs plus vite, plus abondamment et sous forme d'un voile épais; un dépôt important se forme dès le dixième jour au fond des tubes.

c) *Action sur les hétérosides* (à la concentration de 2 p. 100 en milieu peptoné). — Le milieu peptoné additionné respectivement de l'hétéroside choisi, était obtenu en ajoutant une solution concentrée et stérile de peptone pancréatique de panse amenée à $pH = 7,5$ à des solutions stériles d'hétérosides à 2 p. 100, suivant la technique que j'ai indiquée.

En quatre jours, et à 30° , *B. tumefaciens* H. et Ant. ne donnent que des cultures faibles sur ces milieux. Cependant après quinze jours, les cultures sont plus nettes. Les tubes correspondant à la variété H. se sont recouverts d'une légère collerette et les corps microbiens de *B. tumefaciens* Ant. se sont déjà déposés.

Avec les méthylglucosides α et β , on constate une alcalinisation assez nette correspondant à $pH = 7,7$ ou même 8. Les autres hétérosides n'ayant permis qu'un développement très faible, les pH des milieux ont peu varié.

Valeur des pH obtenus en milieu peptoné.

Glucide	pH du témoin	pH après 4 jours		pH après 10 jours	
		H.	Ant.	H.	Ant.
Arbutoside	7,3	7,1	7,4	7,2	7,8
Esculoside		6,2	6,0	6,5	
Salicoside		7,5	7,6	7,1	7,4
Méthylglucoside α .	7,4	7,8	7,8	7,7	7,8
Méthylglucoside β .	7,4	7,8	7,8	7,7	7,8

d) *Action sur les gommés*. — Ayant remarqué l'attaque particulièrement importante de l'arabinose par les deux souches de *B. tumefaciens*, j'ai pensé qu'il serait peut-être intéressant d'étudier comment se comportent ces deux microbes lorsqu'on leur donne une gomme comme seul aliment carboné. J'ai préparé à cette intention une solution de gomme d'abricotier en dissolvant 5 grammes de cette gomme en

poudre dans 100 centimètres cubes d'eau distillée. Le sirop épais obtenu était amené à $pH = 6$ avec de l'ammoniaque diluée, stérilisé en tubes de verre vert par chauffage de 20 minutes à 115° , puis additionné de 1 centimètre cube de solution concentrée T. M.

B. tumefaciens H. et Ant. ont également étéensemencés dans des tubes ne contenant qu'une solution de gomme, sans addition de solution minérale concentrée. Mais cette gomme seule ne suffit pas à donner une culture notable.

En 36 heures, *B. tumefaciens* Ant. forme à la surface du milieu (gomme + sels minéraux), un voile floconneux qui tombe au fond du tube dès le cinquième jour. Au contraire la variété H. donne une culture plus grêle, floconneuse au sein même de la gelée qui reste à peine trouble, même après cinq jours. Après huit jours de culture à 30° , en présence d'arabinose, la réaction du milieu passe de $pH = 6$ à $pH = 4,5$; mais, dans les mêmes conditions, le pH garde sa valeur initiale en présence de gomme d'abricotier. Celle-ci, cependant, peut fournir le carbone nécessaire au développement des deux couches de *B. tumefaciens*; mais le phénomène est trop complexe pour que l'on puisse affirmer qu'il n'y ait pas attaque notable de cette gomme, l'acidification qui se serait produite pouvant être compensée par la formation de quantités importantes de composés basiques.

2° ACTION SUR LES ALCOOLS PLURIVALENTS

Pour étudier l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur le dulcitol, l'érythritol, l'inositol, le mannitol, le sorbitol, le pinitol et le glycérol, je me suis servie d'eau peptonée pancréatique à 20 p. 1.000 amenée à $pH = 7,5$ avec une solution de soude diluée et stérilisée en tubes de verre vert par chauffage de 30 minutes à 120° . Ces alcools plurivalents ont été ajoutés stériles, à la dose de 2 p. 100, dans l'eau peptonée également stérile. Dans le cas du dulcitol, de l'inositol et

du pinitol, j'ai utilisé une eau peptonée au même pH , mais à 20 p. 100, introduite à la dose de XX gouttes pour 10 centimètres cubes de solution d'alcool plurivalent.

B. tumefaciens H. et Ant. gardent sur ces milieux les mêmes caractères qu'en eau peptonée additionnée de glucide. La variété Ant. forme facilement un voile à la surface du liquide. *B. tumefaciens* H. présente une collerette particulièrement nette avec l'érythritol, l'inositol et le sorbitol.

De plus, *B. tumefaciens* Ant. alcalinise, mais très faiblement, l'eau peptonée additionnée d'un des alcools plurivalents étudiés. Seul l'érythritol, après dix jours de culture, donne un pH légèrement plus élevé. La variété H, au contraire, semble produire une légère acidification des milieux additionnés de mannitol et de glycérol, mais seulement au début de la culture. Après dix jours à 30°, tous les milieux ont une réaction nettement alcaline.

Valeur des pH obtenus en milieu peptoné.

Alcool plurivalent	pH du témoin	pH après 4 jours		pH après 10 jours	
		H.	Ant.	H.	Ant.
Mannitol.	7,4	7,2	7,4	7,7	7,7
Dulcitol	7,5	7,4	7,6	7,6	7,8
Erythritol	7,4	7,4	7,6	7,8	8,0
Sorbitol	7,6	7,7	7,6	7,8	7,8
Inositol	7,4	7,4	7,4	7,8	7,8
Pinitol.	7,4	7,5	7,6	8,0	7,8
Glycérol	7,4	7,2	7,6	7,6	7,8

3° ACTION SUR LES ACIDES ACYCLIQUES

Dans trois notes publiées à la Société de Chimie Biologique, A. BERTHELOT et moi-même [17-22-31] avons montré l'intérêt que pouvait présenter l'emploi des sels d'acides gras comme régulateurs de la réaction des cultures microbiennes. Il m'a semblé que cette étude devait être

particulièrement intéressante dans le cas de *B. tumefaciens* puisqu'elle pouvait permettre de déterminer un des facteurs favorables au développement de cette bactérie.

Les acides acycliques, fournis comme source de carbone aux deux souches de *B. tumefaciens*, ont été introduits en quantités équimoléculaires correspondant à 5 p. 1.000 d'acétate de sodium.

a) *Eau peptonée*. — Une solution de peptone pancréatique de panse, additionnée de la quantité nécessaire d'acides gras était amenée à $pH = 7$ avec une solution de soude diluée. Le même milieu non additionné d'acide acyclique servait de témoin. J'ai pris soin de vérifier, qu'après stérilisation par chauffage de 20 minutes à 115° en tubes de verre vert, les pH de tous ces milieux n'avaient subi aucune variation. Seuls les tubes correspondant à l'acide lactique présentaient un pH inférieur à 6, par suite de l'hydrolyse de l'ester lactyl-lactique, à la stérilisation.

Les doses respectives des acides acycliques introduits dans les milieux sous forme de sels neutres de sodium étaient les suivantes :

Ac. formique . . .	3,8 p. 1.000	Ac. butyrique . . .	9,8 p. 1.000
Ac. acétique . . .	5,0 —	Ac. fumarique. . .	9,6 —
Ac. oxalique . . .	11,1 —	Ac. succinique. . .	9,8 —
Ac. propionique . .	6,1 —	Ac. tartrique . . .	12,5 —
Ac. pyruvique . . .	7,8 —	Ac. malique . . .	14,8 —
Ac. lactique . . .	7,5 —	Ac. citrique . . .	17,5 —
Ac. malonique. . .	12,3 —		

Pour les deux variétés de *B. tumefaciens* l'addition du sel de sodium d'un de ces acides gras à l'eau peptonée favorise leur développement. Après 18 heures, 3 jours, ou 8 jours à 30° , cette action est la plus nette, pour *B. tumefaciens* H., avec les acides pyruvique, tartrique, malique et citrique. Avec *B. tumefaciens* Ant. il semble que cette action favorisante soit plus uniforme ; pourtant les acides propionique et butyrique ne permettent que des cultures assez faibles,

même après huit jours, et le pH de ces tubes reste voisin de 7.

Au contraire, après huit jours à 30° , pour les deux variétés de *B. tumefaciens* étudiées, il y a alcalinisation très nette de tous ces milieux. Avec *B. tumefaciens* H., les pH les plus élevés correspondent aux acides malonique, succinique et tartrique et surtout formique, fumarique et malique. Dans le cas de *B. tumefaciens* Ant. les acides acétique, lactique, malonique, succinique et tartrique donnent un pH compris entre 8,3 et 8,6 et ce sont encore les acides formique, fumarique et malique qui fournissent une alcalinité correspondant à $pH = 8,8$.

b) *Milieu synthétique*. — Pour étudier l'utilisation des acides acycliques par les deux variétés de *B. tumefaciens* je me suis servi du milieu synthétique suivant dont l'azote était uniquement ammoniacal.

Eau distillée	1.000 g.
PO^4H^2K	3
SO^4Mg crist.	4
$SO^4(NH^4)_2$	4
Acide gras	q. v.
NH^3	q. s. pour $pH = 7$.

Après stérilisation à 115° pendant 20 minutes les pH de tous les milieux étaient compris entre 6,0 et 7,0. Seul, bien entendu, celui à base d'acide lactique était légèrement acide ($pH = 6,6$).

B. tumefaciens H. ne s'est développé qu'en présence des acides lactique, fumarique, succinique et malique. Après 18 heures, les tubes correspondant à ces acides sont légèrement troubles. Au bout de la première semaine, les trois derniers présentent un voile à la surface ; le tube « lactique » ne montre qu'un trouble uniforme.

De même qu'en milieu peptoné, en milieu synthétique les cultures de *B. tumefaciens* Ant. sont plus abondantes que celles de la variété H. et un plus grand nombre d'acides permettent d'obtenir en 18 heures des cultures d'aspect flo-

conneux : ce sont les acides pyruvique, lactique, succinique et citrique.

Lorsqu'il y a développement microbien les deux variétés déterminent une alcalinisation des milieux. Mais seuls les acides fumarique et malique permettent d'obtenir un pH égal à 8,0 ou 8,2.

Valeur des pH obtenus en milieux peptonés et synthétiques après 8 jours de culture à 30°.

Acide	Milieu peptoné			Milieu synthétique		
	Témoin non ensemencé	H.	Ant.	Témoin non ensemencé	H.	Ant.
Témoin . . .	7,0	7,8	7,8	6,8	6,8	6,8
Formique . .	7,0	8,8	8,8	6,8	6,7	6,7
Acétique . .	7,0	8,4	8,0	6,9	6,8	6,8
Oxalique . .	6,9	7,6	7,7	6,8	6,7	6,8
Propionique .	7,0	7,4	7,6	6,8	6,8	6,8
Pyruvique .	6,7	7,7	7,7	6,8	6,7	6,9
Lactique . .	< 6,0	8,3	8,0	6,6	7,4	7,0
Malonique . .	7,0	8,4	8,6	6,8	6,8	6,8
Butyrique . .	6,9	7,1	7,4	6,8	6,8	6,7
Fumarique . .	7,1	8,8	8,8	7,0	8,3	8,0
Succinique . .	6,9	8,6	8,5	6,8	8,0	7,0
Tartrique . .	7,0	8,4	8,3	6,8	6,7	6,7
Malique . .	7,0	8,8	8,8	6,8	8,2	8,2
Citrique . .	7,1	8,0	7,7	6,8	6,8	6,7

B. — ACTION SUR LES COMPOSÉS AZOTÉS

J'ai étudié quelques uns des caractères des cultures de *B. tumefaciens* sur des milieux renfermant des composés azotés plus ou moins complexes. Mais le sujet est tellement vaste que je me suis bornée, soit aux composés employés le plus couramment en bactériologie, et cela en vue d'essayer d'établir des résultats pratiques, soit à des produits de composition chimique nettement définie, afin de déterminer plus facilement le mode de dégradation de ces substances.

1° ACTION SUR LES PROTIDES

a) *Action sur la gélatine et le blanc d'œuf.* — Ainsi qu'il a été indiqué plus haut, *B. tumefaciens* H. et Ant. ne liquéfient aucunement la gélatine et n'attaquent pas le blanc d'œuf. C'est d'ailleurs, pour la gélatine, ce qui a toujours été constaté par tous les auteurs.

b) *Action sur les peptones.* — Pour cette étude je me suis servie de peptones pepsiques ou pancréatiques, animales ou végétales (peptone riche en tryptophane, peptone de Witte, peptones d'Arachide pepsique et pancréatique, toutes en solution à 20 p. 1.000 ; peptones de soie et éreptone, en solution à 10 p. 1.000). Ces diverses eaux peptonées, amenées à $pH = 7,3$ avec de la lessive de soude diluée, ont été stérilisées à 115° pendant 20 minutes en tubes de verre vert.

Après 48 heures à 30° , les deux variétés s'étaient développées dans tous les tubes ensemencés. L'éreptone, la peptone de Witte et la peptone pepsique P. B. C. ne montraient encore qu'un faible développement. Mais, en eaux peptonées-Arachide pepsique et pancréatique, *B. tumefaciens* H. avait déjà provoqué un trouble très net et même l'apparition d'un voile. Celui-ci était encore plus épais dans les tubes d'eau peptonée-Arachide correspondant à la variété Ant. Après 15 jours, à la même température de 30° , les meilleures cultures des deux variétés avaient été fournies par l'eau peptonée pepsique d'Arachide, alors que la peptone de Witte et l'éreptone n'avaient permis, au contraire, qu'un faible développement.

Recherche de l'indol. — D'après E. SMITH [180] *B. tumefaciens* produirait une faible quantité d'indol en eau peptonée. En me servant du réactif d'EHRlich (p.-diméthylaminobenzaldéhyde) suivant la technique indiquée par A. BERTHELOT [9], j'ai recherché ce produit dans les cultures obtenues sur diverses peptones, soit après 48 heures, soit après 15 jours de développement à 30° .

Pour cela, je les alcalinisais nettement avec quelques gouttes de lessive de soude, puis je les agitais avec leur volume d'éther. Lorsque la séparation des deux liquides ne se produisait pas facilement, j'ajoutais au mélange quelques gouttes d'alcool. A 3 ou 4 centimètres cubes environ de la solution éthérée, aspirée avec soin à l'aide d'une pipette effilée afin de n'entraîner aucune trace de peptone, j'ajoutais 1 centimètre cube environ de la solution alcoolique de p.-diméthylaminobenzaldéhyde, puis, après agitation, quelques centimètres cubes d'acide chlorhydrique en prenant soin de verser lentement l'acide le long de la paroi interne du tube. La présence de traces d'indol se révèle par la formation d'un anneau rouge légèrement violacé. Jamais en employant cette technique je n'ai pu déceler la présence de cette substance dans les cultures des deux variétés H. et Ant.

Recherche de l'acide indol-3-acétique. — La recherche de l'acide indol-acétique, effectuée sur des cultures de 4 jours en eau peptonée (p.-pancréatique de panse) préalablement reconnue exempte d'indol et de corps indologènes libres, n'a donné aucune coloration rose par la réaction de Sal-kowsky.

Formation de H^2S . — E. F. SMITH [180] avait indiqué la présence d'hydrogène sulfuré dans les cultures de *B. tumefaciens*. J'ai vérifié, en me servant de gélose peptone-pancréatique de panse additionnée, avant stérilisation, de 1 p. 1.000 d'acétate de plomb que les deux variétés H. et Ant. produisaient, en 48 heures, de l'hydrogène sulfuré en quantité suffisante pour provoquer la coloration en noir des colonies.

Au contraire, la même technique employée avec de la peptone pepsique-Arachide indiquait que *B. tumefaciens* H. et Ant. ne pouvaient produire de l'hydrogène sulfuré sur ce milieu.

2° ACTION SUR LES ACIDES AMINÉS

J'ai étudié l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les acides aminés à l'aide du milieu synthétique indiqué par A. BERTHELOT pour l'étude des bactéries acidaminolytiques vraies. Il présente la composition suivante :

Eau distillée	1.000 g.
PO ⁴ H ² K	2
SO ⁴ Mg crist.	0,5
Acide aminé	1 à 2 g.

Le pH doit être égal à 7 environ avant l'ensemencement. Or, si les divers milieux avaient été préparés simplement en dissolvant les acides aminés ou leurs chlorhydrates dans une solution contenant 2 p. 1.000 de phosphate monopotassique et 0,5 p. 1.000 de sulfate de magnésium cristallisé, on n'aurait pu éviter une certaine décomposition de l'acide aminé lors de la stérilisation, surtout avec certains amino-acides, et même en prenant de grandes précautions pour l'ajustage à pH = 7. Il m'a donc semblé nécessaire d'employer, pour la préparation de ces milieux, une technique beaucoup plus compliquée, mais plus sûre (A. BERTHELOT) [14].

Les solutions en eau distillée d'alanine et de tyrosine à 2 p. 1.000, de tryptophane, de proline et de chlorhydrate de lysine à 1 p. 1.000 sont à pH = 7. Elles ont été stérilisées sans ajustage préalable. Au contraire, les mêmes solutions à 2 p. 1.000 de glycolle, de leucine, de phénylalanine, de chlorhydrate d'histidine, d'asparagine, d'acides aspartique et glutamique ont dû être amenées à pH = 6,7 par addition d'une solution très diluée de carbonate de sodium neutre pur. Les solutions alcalines à 1 p. 1.000 d'arginine et de sarcosine, ont été amenées à pH = 6,7 avec une solution très diluée d'acide orthophosphorique. La cystine étant insoluble à la concentration de 1 p. 1.000, j'en ai fait une suspension que j'ai amenée à pH = 6,7 avec une liqueur très diluée d'acide chlorhydrique. Toutes ces solutions d'acides aminés, réparties par 10 centimètres cubes en tubes de verre vert, ont été stérilisées par trois chauffages d'une heure à 100°, à 24 heures d'intervalle.

J'ai vérifié que l'introduction de 11 gouttes (0 cm³ 1) d'une solution A de phosphate monopotassique à 20 p. 100 amenée à pH = 6,7 avec une liqueur de soude diluée, ne faisait pas varier le pH, égal à 7, de 10 centimètres cubes d'une autre solution B, à 0,5 p. 1.000, de sulfate de magnésium. Les deux solutions A et B ont été stérilisées par chauffage de 15 minutes à 120° en tubes Pyrex. Puis 11 gouttes de chacune des solutions stériles A et B furent introduites aseptiquement dans chacun

des tubes contenant 40 centimètres cubes d'une des solutions d'acides aminés également stériles.

Après vérification du pH de chaque milieu les tubes ont été respectivement ensemencés avec les deux variétés H. et Ant. et mis à l'étuve à 30°. Voici les résultats obtenus :

Après 18 heures, *B. tumefaciens* H. et Ant. fournissent des cultures abondantes dans les milieux contenant soit l'asparagine, soit l'acide aspartique ou l'acide glutamique. L'alanine, l'histidine, la proline, la cystine et la sarcosine permettent un développement des deux variétés qui ne se produit pas avec le glycocolle, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Seules la leucine et la lysine sont attaquées, faiblement il est vrai, par *B. tumefaciens* Ant., sans l'être par la variété H.

Après trois et huit jours, il est très net que c'est d'abord en présence d'acide glutamique, puis d'acide aspartique, d'asparagine, de proline, d'histidine et d'arginine que l'on obtient les meilleures cultures.

L'alcalinisation de tous ces milieux est très marquée et correspond à des pH compris entre 7,7 et 8,4, voire même 8,8 ou 9,0 pour les cultures en milieux aspartique et glutamique.

Valeurs des pH obtenus en milieu synthétique.

Acide aminé	pH avant l'ensemencement	pH après 8 jours		Acide aminé	pH avant l'ensemencement	pH après 8 jours	
		H.	Ant.			H.	Ant.
Glycocolle . .	7,2	7,2	7,2	Histidine . .	7,2	8,4	8,4
Sarcosine . .	7,2	8,2	7,8	Lysine . . .	7,2	7,2	7,2
Alanine . . .	7,2	7,6	7,3	Arginine . .	6,8	7,7	7,8
Phénylalanine	7,2	7,2	7,2	Cystine . . .	7,0	7,4	7,2
Leucine . . .	7,2	7,2	7,2	Arginine . .	6,8	7,7	7,8
Tyrosine . . .	7,2	7,2	7,2	Ac. glutamique	7,2	9,0	8,8
Proline . . .	7,2	7,7	7,6	Ac. aspartique.	7,2	8,8	8,8
Tryptophane .	7,2	7,2	7,2	Asparagine .	6,9	8,2	8,4

3° ACTION SUR LES AMINES

J'ai essayé d'établir si les amines peuvent, soit constituer pour ces deux variétés la source du carbone qui leur est nécessaire, ou leur unique source d'azote, soit leur fournir à la fois ces deux éléments.

Je me suis servie et, pour les mêmes raisons, de la technique indiquée au paragraphe précédent. Les solutions d'amines libres (diéthylamine, éthylène diamine, putrescine, créatine, pyridine, pipéridine) à 2 p. 1.000 ont été amenées à $pH = 6,8$ à l'aide d'une liqueur très diluée de PO^4H^3 . Lorsque le produit était introduit sous forme de sels d'amines (chlorhydrates de triméthylamine, d'amylamine, de choline, de glucosamine, de neurine, de guanidine, de bétaine, de p. oxyphényléthylamine, sulfate d'hordénine), la solution du sel était d'abord additionnée d'une liqueur de soude assez diluée et en quantité nécessaire pour libérer la base, puis ramenée à $pH = 6,8$ avec la solution d'acide phosphorique. Les stérilisations ont été effectuées par 3 chauffages de 1 heure à 100° , à 24 heures d'intervalle. Seules les solutions de choline, de glucosamine, de neurine et de guanidine ont été stérilisées par filtration sur bougie.

a) *Amines seules sources de carbone.* — L'azote nécessaire au développement des deux variétés leur a été fourni sous forme de sulfate d'ammonium, ajouté aseptiquement à la dose de 3,88 p. 1.000 (soit 1 p. 1.000 de NH^3) à l'aide d'une solution stérile à 19,4 p. 100 introduite à la dose de IV gouttes ($0\text{ cm}^3\text{ }2$) pour 10 centimètres cubes de solution d'amine (triméthylamine, choline, bétaine, guanidine, hordénine).

De même que dans l'étude de l'attaque des acides aminés, et aux mêmes doses, le phosphate monopotassique et le sulfate de magnésium étaient introduits aseptiquement dans les milieux dont le pH avait été vérifié avant l'ensemencement.

Dans ces conditions, la triméthylamine et l'hordénine n'ont permis aucun développement, même en 10 jours à 30°. Dans les cultures obtenues avec la choline et la bétaine le milieu était nettement trouble ; avec la variété H. la surface du liquide nutritif était recouverte d'un voile grimpant.

En général la réaction du milieu restait sans changement ; mais *B. tumefaciens* H., en présence de choline, faisait cependant varier le pH de 6,8 à une valeur légèrement inférieure à 6.

La bétaine, la guanidine et surtout la choline peuvent donc constituer une source du carbone nécessaire au développement de *B. tumefaciens* H. et Ant.

b) *Amines, seules sources d'azote.* — Le carbone a été fourni aux deux variétés sous forme de glucose ajouté aseptiquement à la dose de 5 p. 1.000. Une solution de ce sucre, stérile et à 30 p. 100, était introduite à la dose de III gouttes (0 cm³ 15) dans 10 centimètres cubes de solution des mêmes amines. Le phosphate monopotassique et le sulfate de magnésium étaient ajoutés aseptiquement aux milieux étudiés, et aux mêmes doses que ci-dessus, avant de vérifier le pH obtenu.

Dans ces conditions, la triméthylamine et l'hordénine n'ont encore permis aucun développement. Les trois autres amines permettaient d'obtenir de bonnes cultures, meilleures encore que dans le cas où l'amine constituait la seule source de carbone. En présence de choline *B. tumefaciens* Ant. formait même, en dix jours, un voile assez épais.

Le pH des cultures obtenues indiquait une acidification nette des milieux, et passage de pH = 7,0 ou 7,4 à pH = 6,6 ou même 6,4.

La bétaine, la guanidine et la choline peuvent donc constituer pour les deux variétés H. et Ant. leur unique source d'azote.

c) *Amines seules sources de carbone et d'azote* (1). — De toutes les amines étudiées (triméthylamine, diéthylamine, amylamine, choline, glucosamine, neurine, putrescine, éthylène-diamine, créatine, guanidine, bêtaïne, p. oxyphényl-éthylamine, pyridine, pipéridine, hordénine), en milieu synthétique ne contenant ni glucose, ni sulfate d'ammonium, seules la bêtaïne, la créatine et surtout la glucosamine, ont permis d'obtenir un développement des deux variétés H. et Ant. La choline, au contraire, n'a pu être utilisée à la fois comme source de carbone et d'azote que par *B. tumefaciens* H.

Dans tous les cas le pH des milieux n'avait subi aucune variation.

Action sur une base purique (caféine) et différents alcaloïdes. — En me servant de la même technique et du même milieu ne contenant ni glucose ni sulfate d'ammonium, j'ai essayé de voir si la caféine et d'autre part, l'atropine, la cocaïne, la pilocarpine, la papavérine, la morphine, la quinine, la strychnine et la spartéine, pouvaient être assimilées par *B. tumefaciens* H. et Ant.

En 10 jours, à 30°, dans les conditions de milieu indiquées, aucune de ces substances n'a permis le moindre développement des deux variétés.

4° ACTION SUR L'URÉE ET L'ALLANTOÏNE

Ayant à nouveau utilisé exactement, dans cette étude, la technique et le milieu employés pour déterminer l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les acides aminés, je n'indiquerai ici que les résultats obtenus et noterai simplement que les solutions ont été stérilisées par filtration sur bougie.

(1) Pour la classification de ces amines je me suis servie de celle adoptée par M. GUGGENHEIM [89] et qui figure dans l'édition française des « Amines biologiques » publiée par A. BERTHELOT, A. R. PRÉVOT et G. KARL.

L'urée et l'allantoïne n'ont permis d'obtenir, avec *B. tumefaciens* H. et Ant., qu'un développement microbien très faible, rapidement autolysé, sans doute par suite de l'élévation du pH final. En effet ces milieux, et tout particulièrement ceux additionnés d'urée, se sont alcalinisés très fortement et le pH est passé, en dix jours, de $pH = 7,2$ à $pH = 8,8$.

5° ACTION SUR LES COMPOSÉS AZOTÉS MINÉRAUX

a) *Utilisation de l'azote ammoniacal.* — Dans les milieux qui m'ont servi à étudier les caractères biochimiques des deux variétés H. et Ant., l'ammoniaque a été souvent la seule source d'azote ; cet élément y était introduit soit sous forme de sulfate d'ammonium — et, parfois, de traces de sulfate de fer ammoniacal — soit sous forme d'une solution d'ammoniaque diluée, utilisée pour l'ajustage à $pH = 6,7$ ou $6,8$. Il m'a semblé qu'il était donc suffisant de noter que l'azote introduit sous cette forme permettait le développement de *B. tumefaciens* H. et Ant.

b) *Action sur les nitrates.* — E. SMITH, N. A. BROWN et C. O. TOWNSEND (1911) [185] ont indiqué que *B. tumefaciens*, en bouillon additionné de nitrate, ne pouvait réduire celui-ci. ISRAILKY (1929) [95] possédait une souche de *B. tumefaciens*, isolée de nodosités de lupin, qui pouvait attaquer les nitrates, mais très lentement.

Utilisant la technique indiquée par Grimbert en 1903 [88], j'ai préparé le milieu ci-dessous :

Eau distillée	1.000 g.
Peptone pancréatique de panses	1
NO ³ K	1

Cette eau peptonée, amenée à $pH = 7$ avec une solution de soude diluée, a été répartie en tubes de verre vert et stérilisée à 115° pendant 20 minutes. D'autre part, du bouillon de bœuf additionné de 1 p. 100 de nitrate de potassium était amené à $pH = 7,5$ et stérilisé également à 115° pendant 20 minutes en tubes de verre vert. Les deux milieux étaientensemencés avec *B. tumefaciens* H. et Ant.

La formation de nitrite dans les cultures était mise en évidence par l'apparition immédiate d'une coloration rose lorsqu'on ajoutait une goutte de la liqueur étudiée, à 3 centimètres cubes de β naphthylamine à 0,1 p. 100 additionnés de X gouttes d'acide sulfurique concentré.

Après 12 jours de développement à 30° la réaction des nitrites était nettement positive dans les tubes d'eau peptonée nitratée ensemencés avec *B. tumefaciens* H., plus faiblement dans ceux correspondant à *B. tumefaciens* Ant. En bouillon nitraté, la réaction de GRIESS restait négative.

Sur ces milieux, aucune des deux variétés ne produisait un dégagement d'azote, du moins assez notable pour qu'il y ait formation, à la surface du liquide, de mousse plus ou moins abondante comme cela se produit avec les dénitrifiants énergiques.

Comme il ne m'a pas été matériellement possible jusqu'ici d'effectuer les extractions et analyses de gaz qui m'auraient permis de déterminer à quel groupe appartenaient les deux variétés étudiées, je ne puis donc que noter le léger pouvoir dénitrifiant de *B. tumefaciens* H. et Ant.

Après avoir étudié et comparé entre eux les caractères biologiques et biochimiques de *B. tumefaciens* H. et Ant., il semble que l'on puisse conclure que ces deux variétés présentent entre elles plus de ressemblances que de différences.

J'ai indiqué en effet que *B. tumefaciens* Ant. se caractérise par un polymorphisme plus grand, une tendance très marquée à donner des cultures d'aspect floconneux, soit en milieux d'origine animale ou végétale, soit même en milieux synthétiques. J'ai noté, d'autre part, que cette même variété Ant. est seule capable de se développer sur les milieux liquides ou gélosés préparés avec une macération de Betterave rouge.

Mais ces quelques divergences sont de peu d'importance comparativement aux analogies que l'on rencontre en étu-

diant les caractères « bactériologiques » fondamentaux des deux variétés. Effectivement, celles-ci ne liquéfient pas la gélatine, ne provoquent pas la coagulation du lait et ne donnent pas d'indol. De plus, les différences qui ont pu être relevées dans l'étude des cultures obtenues en présence de glucides par exemple, pourraient être attribuées plutôt au développement précoce et abondant de la variété H. qu'à des particularités biochimiques que, seule, l'examen des produits formés dans les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. pourrait révéler.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE BIOCHIMIQUE COMPARATIVE DES DEUX VARIÉTÉS DE *BACTERIUM TUMEFACIENS*

Je me suis proposée dans la deuxième partie de mon travail d'étudier qualitativement, et même le plus souvent possible quantitativement, les produits formés dans les cultures des deux variétés, soit en milieux peptonés, soit en milieux synthétiques, additionnés ou de divers composés ternaires ou de plusieurs produits azotés. La question étant très vaste en raison du grand nombre, et de composés intéressants et de conditions possibles d'expérimentation (pH , température, âge des cultures, etc.), je me suis limitée à l'étude de certains milieux, soit intéressants à cause de leur emploi fréquent en bactériologie, soit présentant une importance théorique spéciale.

D'autre part, j'ai essayé de déceler chez *B. tumefaciens* l'existence de diastases intervenant ou dans les phénomènes signalés au cours de ce travail, ou dans l'action pathogène de cette bactérie.

CHAPITRE PREMIER

ACTION SUR LES COMPOSÉS TERNAIRES

Dans ce chapitre, et pour les raisons indiquées plus haut, je me suis surtout intéressée à l'étude des produits formés dans l'attaque des glucides, et particulièrement du glucose. J'ai cependant tenu à indiquer d'une manière plus sommaire quelques résultats relatifs aux cultures des deux variétés en milieux ou glycérolés, ou additionnés d'acide pyruvique.

A. — ACTION SUR LES GLUCIDES

Des cultures, soit en eau peptonée additionnée ou non de carbonate de calcium, soit en milieux synthétiques, ont servi à rechercher, après des intervalles de temps divers, les composés alcooliques, aldéhydiques ou cétoniques, les acides volatils ou fixes qui résultent de l'activité microbienne de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur ces milieux. De plus, ces bactéries étant essentiellement aérobies, M. le Prof. G. BERTRAND m'a vivement conseillé d'étudier spécialement les produits d'oxydation qui auraient pu se former dans les cultures additionnées de glucose, de fructose et d'arabinose.

Glucose.

ACTION SUR LE GLUCOSE EN MILIEUX PEPTONÉS GLUCOSÉS. — On sait que le carbonate de calcium que l'on introduit fréquemment dans les milieux de culture sucrés, sature, au fur

et à mesure de leur formation, tous les acides élaborés par le microbe utilisé. Il était donc intéressant d'étudier les produits formés par *B. tumefaciens* H. et Ant., d'une part en eau peptonée glucosée simple, d'autre part dans ce même milieu, mais en présence d'un excès de carbonate de calcium.

L'eau peptonée (p. pancr. de panses à 20 p. 1.000 additionnée de 20 p. 1.000 de glucose) était amenée à $pH = 7$ avec une solution de soude diluée, filtrée sur « carton mou », puis répartie en fioles coniques par 1.500 centimètres cubes et stérilisée par un chauffage de $3\frac{1}{4}$ d'heure à 115° . D'autre part, selon la technique indiquée par A. BERTHELOT et Mlle M. CHADUC [28], 15 grammes de carbonate de calcium précipité léger (Codex 1884), additionnés de 50 centimètres cubes d'eau distillée étaient, après stérilisation de $3\frac{1}{4}$ d'heure à 134° en fioles Pyrex, introduits aseptiquement dans l'eau peptonée, elle-même stérile. Les fioles étaient alors placées 48 heures à l'étuve à 37° afin de vérifier leur stérilité, puis ensemencées massivement avec une émulsion dans l'eau distillée de cultures de 48 heures sur gélose de l'une des deux variétés.

Après 3 semaines à 30° les cultures en eau peptonée glucosée, soit exemptes de carbonate de calcium, soit contenant un excès de ce sel, ont été traitées de la même façon pour caractériser les divers produits formés. Il en a été de même pour les cultures âgées de quatre mois en eau peptonée additionnée de carbonate de calcium.

Technique générale de l'analyse. — Après vérification de leur pureté, les cultures étaient d'abord filtrées sur « carton mou » Durieux. Dans le dépôt, je recherchais toujours au microscope la présence éventuelle d'oxalate de calcium. Je ramenait la réaction du milieu à la neutralité avec une solution de carbonate de sodium saturée. Puis, la culture filtrée était distillée dans le vide au bain-marie à 70° . La portion distillée, A, recueillie dans un récipient soigneusement refroidi, et correspondant aux trois cinquièmes environ du

volume primitif, servait à la recherche des composés alcooliques, aldéhydiques et cétoniques.

A cet effet, la solution A légèrement alcaline était neutralisée avec quelques gouttes d'acide sulfurique N/10, puis introduite dans un ballon à distiller muni d'une colonne à rectifier Vigreux, et distillée à nouveau afin de recueillir dans un récipient entouré d'un mélange de glace et de sel, et par portions de 10 cm³ environ, les produits volatils obtenus dans les cultures. La recherche des aldéhydes, des alcools et des cétones volatils était réalisée à l'aide des réactions suivantes.

La réduction du nitrate d'argent ammoniacal à chaud, la recoloration de la fuchsine bisulfitée, indiquaient la présence d'aldéhyde. Le réactif de LEGAL (nitroprussiate de sodium et soude, puis acide acétique), le réactif de DENIGÈS (sulfate mercurique) permettaient de mettre en évidence les cétones. J'effectuais la réduction du bichromate de potassium en solution à 0,5 p. 100 dans l'acide nitrique concentré, ainsi que celle du chromate de potassium en solution sulfurique. Je recherchais la formation d'iodoforme en ajoutant à 2 cm³ de liqueur étudiée, d'abord I ou II gouttes de lessive de soude, puis à la température de 40° ou 45°, une solution d'iode introduite goutte à goutte jusqu'à légère coloration jaune. La forme des cristaux était vérifiée au microscope.

Ces réactions, comparées entre elles et avec celles qui permettent de déterminer la présence de cétone ou d'aldéhyde, permettaient de noter la présence d'alcool.

Je recherchais la présence de phénol, d'une part à l'aide d'une solution très diluée de chlorure ferrique, d'autre part avec le réactif de MILLON.

L'acétylméthylcarbinol était décelé dans les solutions capables de réduire la liqueur cupro-potassique à froid, par la déviation notée au polarimètre, et surtout par la réaction de LEMOIGNE.

Le résidu B de la première distillation était ramené au volume primitif, puis additionné de la quantité d'acide oxa-

lique juste nécessaire pour précipiter d'abord tout le calcium dissous à l'état de sel, puis pour amener la réaction à un μH nettement acide (BLANCHETIÈRE) [44]. Après filtration, cette solution B était distillée rapidement dans le vide au bain-marie bouillant afin d'entraîner les acides volatils. Ceux-ci étaient alors déterminés soit à l'aide de la distillation de Duclaux (70), soit en essayant d'appliquer la méthode de séparation d'AGULHON sur la solution de leurs sels de sodium. Mais je me suis trouvée dans des conditions analogues à celles indiquées par AUBEL [1] dans son travail sur le B. pyocyannique. Les quantités d'acides volatils obtenues étaient trop faibles pour donner des réactions nettement positives par cette méthode de séparation chimique. Celle-ci ne m'a donc servi qu'à confirmer les résultats fournis par la distillation de Duclaux.

J'ai cherché à mettre en évidence les propriétés réductrices de l'acide formique. Les réactions ont toujours été négatives.

L'acide acétique était caractérisé par la formation du cacodyle.

J'ajoutais son volume d'éther à la solution concentrée des sels de sodium obtenus, puis, goutte à goutte, une solution de sulfate de cuivre à 2 p. 100. La coloration bleue de la solution étherée indiquait la présence possible d'acide valériannique. Une autre portion de la solution primitive était alors additionnée de son volume de benzène et d'une goutte de la même solution de sulfate de cuivre. La coloration bleue du benzène confirmait la présence d'acide valériannique, déjà nettement reconnu, d'ailleurs, par l'odeur si caractéristique qui apparaissait à l'évaporation de l'extrait étheré.

Enfin le liquide C, résidu de la distillation des acides volatils contenant les acides fixes, était d'abord débarrassé de l'acide oxalique, introduit en léger excès, par addition d'une solution de chlorure de calcium. Après séparation par filtration de l'oxalate de calcium formé, la liqueur était à

nouveau acidifiée par de l'acide sulfurique qui précipitait le calcium et libérait les acides fixes. La solution acide était ensuite épuisée 5 ou 6 fois par son volume d'éther. La liqueur éthérée contenant les acides ~~folatils~~^{volatils} était distillée au bain-marie, et le très faible résidu repris par un peu d'eau, puis chauffé un quart d'heure au bain-marie bouillant afin d'hydrolyser l'ester lactyl-lactique qui aurait pu se former (BLANCHETIÈRE) [44, p. 32].

Sur cette solution aqueuse, où les acides fixes produits dans les 1.500 centimètres cubes de culture étaient réunis sous le faible volume de 5 ou 10 centimètres cubes, je recherchais la formation d'acide lactique ou d'acide succinique. Jamais je n'ai pu obtenir de cristaux d'acide succinique que j'aurais pu reprendre par quelques centimètres cubes d'éther, essorer à la trompe, laver à l'éther, suivant la technique indiquée par BLANCHETIÈRE. Malgré cela j'ai recherché les traces de cet acide dans la solution aqueuse, à l'aide de quelques gouttes d'ammoniaque et de chlorure ferrique, en essayant de noter la formation d'un précipité ocre, gélatineux, de succinate de fer.

De plus, la recherche de l'acide lactique a été effectuée soit avec le réactif de BERG, soit par la réaction d'UFFELMANN, soit par l'essai de formation de cristaux de lactate de zinc, soit enfin par la réaction de HOPKINS, au thiophène, pratiquée directement sur le résidu d'évaporation de l'extrait éthéré. Les réactions des acides-alcools s'étant toujours montrées négatives je n'ai pas essayé d'identifier l'acide glycolique.

Toutes ces déterminations pratiquées sur les cultures ont été contrôlées, soit avec des solutions-témoins contenant les composés recherchés, soit avec les produits obtenus dans les mêmes conditions à l'aide d'un microbe nettement saccharolytique, voisin de *Bacterium lactis aerogenes* et de *B. pneumoniae* FRIEDLENDER.

RÉSULTATS OBTENUS. — 1° *Cultures en eau peptonée non additionnée de carbonate de calcium.* — L'étude des produits résultant de l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les glucides a d'abord été pratiquée sur une eau peptonée (p. pancréatique de panses à 20 p. 1.000 ; $pH = 7,5$), non additionnée de carbonate de calcium.

B. tumefaciens H. et Ant. alcalinisent fortement ce milieu dont le pH passe de la valeur 7,5, obtenue après trois semaines, à la valeur 8,5 ou 8,8 notée après quatre mois.

La proportion de composés ammoniacaux est notable. L'alcool n'a pu être décelé qu'en quantités minimales. D'autre part, les traces de composés aldéhydiques sont si peu importantes qu'elles ne permettent qu'une recoloration très légère du réactif de Schiff.

La proportion d'acides volatils élaborés est faible. ISRAILKY [94] avait déjà noté qu'en bouillon sucré additionné de peptone (glucose 10 ou 15 p. 1.000), la formation des acides volatils par *B. tumefaciens* était insignifiante. Néanmoins, et d'après les courbes reproduites p. 65, et d'après les réactions de vérification opérées, il apparaît très nettement qu'il se forme au début du développement, et dans les deux cas, surtout de l'acide acétique. Puis, après 4 mois, la proportion d'acide valérianique est devenue notablement plus forte que celle de l'acide acétique et correspond sensiblement à 3 parties d'acide valérianique pour 1 partie d'acide acétique (variété H), et même 5 parties d'acide valérianique pour 1 partie d'acide acétique (variété Ant.).

La présence d'aucun acide fixe n'a pu être décelée ni après trois semaines, ni après quatre mois de développement à 30°.

Etant donné les résultats négatifs ou seulement très faiblement positifs obtenus, j'ai préparé des quantités plus grandes de cultures afin de pouvoir, peut-être, déceler plus sûrement les traces de produits formés.

La distillation des dix litres de cultures était alors opérée dans un alambic en cuivre muni d'une colonne rectificatrice haute de 1 m. 50 environ suivie d'un long serpentín en cuivre étamé. Je recueillis le premier litre en m'assurant que le liquide qui distillait alors ne présentait plus la réaction de SCHIFF. La liqueur A obtenue était rectifiée à l'aide d'une colonne ROBERT et fractionnée par portions successives de 10, 20, 75 et 100 centimètres cubes. Le liquide qui distillait ensuite ne recolorait plus la fuchsine bisulfitée.

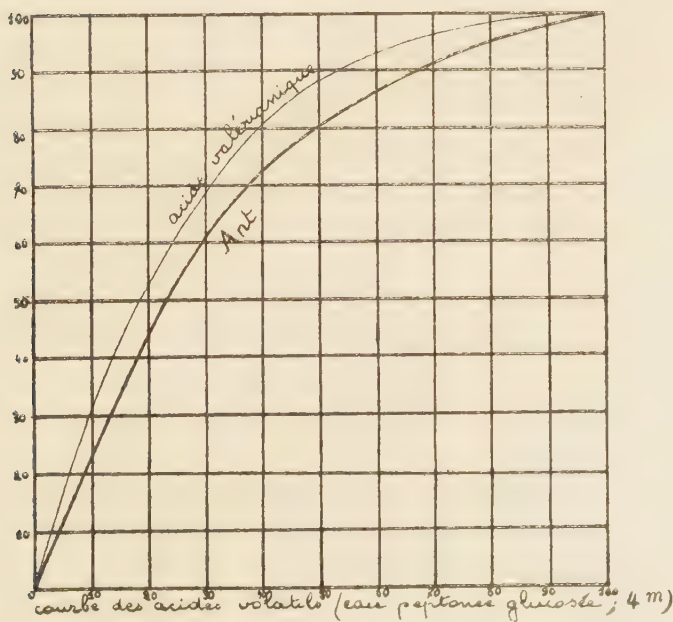
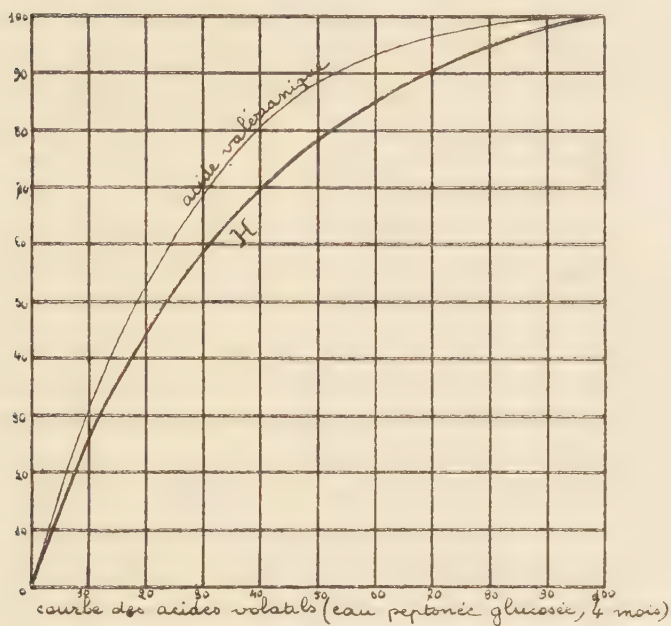
Le résidu B de la première distillation, ramené au volume initial et acidifié par l'acide phosphorique, était à nouveau distillé dans un alambic surmonté d'un grand brise-mousse en Pyrex. Le liquide recueilli servait à la recherche des acides volatils après neutralisation par le carbonate de sodium et évaporation à siccité au bain-marie.

La portion C contenant les acides fixes était neutralisée par la soude, puis concentrée à 500 centimètres cubes au bain-marie, réacidifiée par l'acide sulfurique, et, après refroidissement, épuisée quatre fois par son volume d'éther. Cet extrait éthéré était enfin distillé à basse température et le résidu obtenu examiné comme il est dit plus haut.

Ces cultures des deux variétés, présentaient, au bout de 5 jours à 30°, une très légère acidité correspondant à $pH = 6,5$.

La formation d'alcool, dans les deux cas, était nette, quoique faible. Au contraire, la présence d'aldéhyde n'a pu être décelée qu'avec la variété Ant. et dans des proportions relativement minimales si l'on songe à la grande sensibilité de la réaction. Enfin, je n'ai jamais trouvé d'acétone.

Les acides volatils ont été produits en quantités excessivement faibles; les courbes obtenues correspondent sensiblement à celle de l'acide acétique, avec pourtant un léger point d'inflexion vers le bas causé par la présence de traces (1/20 environ de la teneur en acide acétique), d'acide valé-



rianique. D'ailleurs, en pratiquant deux distillations de Duclaux, l'une sur les produits de tête, l'autre sur les produits de queue, j'obtenais bien deux courbes dont l'une indiquait une proportion plus grande d'acide valérianique.

La recherche des acides fixes dans ces dix litres de cultures m'a permis de déceler, par les techniques déjà indiquées, la présence de faibles traces d'un produit présentant les réactions d'un acide-alcool. Mais je ne peux affirmer s'il s'agissait de l'acide lactique, puisque je n'ai pu en faire le sel de zinc.

2° *Cultures en eau peptonée additionnée de carbonate de calcium.* — Afin de favoriser l'élaboration des acides dans les cultures, j'ai additionné l'eau peptonée d'une bouillie de carbonate de calcium, suivant la technique déjà précisée.

Erwin F. SMITH [177] indique que ses collaborateurs ALSBERG, BREWSTER et WOODWARD ont étudié les produits formés par *B. tumefaciens* dans une solution aqueuse de peptone de Witte à 10 p. 1.000 additionnée de 10 p. 1.000 de glucose et d'un peu de CO_3Ca . Après 8 ou 9 semaines, ils ont pu déceler la présence d'aldéhyde, d'alcool, d'acétone, d'acide formique dans tous les cas, d'acide acétique seulement à partir de quelques souches. Jamais ils n'ont pu noter la présence d'un acide fixe. Dans les cultures âgées de deux mois et demi, ces mêmes auteurs trouvaient encore de l'aldéhyde et de l'acide formique, mais ne pouvaient déceler ni alcool, ni acétone.

Après trois semaines à 30 degrés, mes cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. en eau peptonée glucosée additionnée de carbonate de calcium présentaient une réaction correspondant environ à $\text{pH} = 6$. J'ai pu noter la formation abondante, par les deux variétés, de produits ammoniacaux et de quantités très faibles d'alcool et d'aldéhyde. La proportion d'acides volatils obtenus est peut-être moins minime qu'en eau peptonée glucosée simple, mais elle reste toujours peu importante. Cependant les courbes des distillations de

DUCLAUX permettent de déterminer approximativement que les proportions d'acide acétique et d'acide valérianique formés sont dans le rapport de 1 à 15 pour la variété H. et de 1 à 4 pour la variété Ant. C'est donc encore, dans ce cas, les cultures de *B. tumefaciens* Ant. qui sont les plus riches en acide valérianique.

Recherche spéciale de la formation d'acide oxalique. — Une eau peptonée glucosée (peptone pepsique Arachide 20 p. 1.000, glucose 20 p. 1.000), amenée à $pH = 6$ avec une solution diluée d'acide phosphorique était répartie par 200 centimètres cubes en fioles coniques Sibor, puis stérilisée par chauffage à 115° pendant un quart d'heure. Trois fioles étaient additionnées, après stérilisation, d'une bouillie stérile de carbonate de calcium. Quatre fioles (deux additionnées de CO^3Ca , deux autres exemptes de CO^3Ca), étaient ensemencées respectivement avec *B. tumefaciens* H. et Ant. Les deux autres servaient de témoins. Après deux mois de séjour à 30° , j'ai examiné au microscope les dépôts qui s'étaient formés dans les différentes fioles. Aucun ne présentait de cristaux d'oxalate de calcium. Il semblait donc bien qu'il n'y avait pas eu formation d'acide oxalique.

Pour m'en assurer j'ai filtré les cultures en eau peptonée non additionnées de CO^3Ca et je les ai neutralisées avec de l'ammoniaque diluée ; j'y ai ajouté alors une solution limpide de chlorure de calcium. Après agitation, puis repos de plusieurs jours à la glacière, le sédiment séparé par centrifugation n'a présenté, par examen au microscope, aucun cristal d'oxalate de calcium. Ces cultures ne contenaient donc pas d'acide oxalique libre.

Celles en eau peptonée additionnée de CO^3Ca ont été soumises quelques instants à l'ébullition, puis abandonnées à la glacière. Le dépôt contenant d'une part le carbonate de calcium, et d'autre part l'oxalate de calcium éventuellement formé a été recueilli par centrifugation et lavé à l'eau. De faibles quantités de chacun des précipités ont été mises dans

des verres et additionnées, avec précaution, d'une solution très diluée d'acide acétique afin de dissoudre le carbonate de calcium sans toucher à l'oxalate. Dans le résidu examiné au microscope je n'ai également pas trouvé de cristaux d'oxalate de calcium.

Il semble donc qu'on puisse affirmer que, dans ces conditions, du moins, il ne s'est pas formé d'acide oxalique dans les cultures.

Recherche spéciale de la formation d'acétylméthylcarbinol.

— Depuis les belles recherches de LEMOIGNE [107] on a la certitude que l'acétylméthylcarbinol est produit fréquemment dans l'attaque du glucose par les bactéries. Je me suis donc proposé de le rechercher tout spécialement puisque, seules, les cultures en grand des deux variétés m'avaient permis de déceler la présence de ce produit.

La réaction de LEMOIGNE a été chaque fois effectuée après distillation directe des cultures en présence de perchlorure de fer, selon la technique employée par H. VIOLE [198]. Les trois ou quatre premiers centimètres cubes recueillis étaient additionnés de XV à XX gouttes d'ammoniaque, de V gouttes de solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à 20 p. 100 et de V gouttes de chlorure de nickel à 10 p. 100. En présence d'acétylméthylcarbinol, il se forme dans ces conditions un précipité rouge, plus ou moins abondant, de nickel-diméthylglyoxime.

Le choix de la peptone employée dans cette recherche semble être assez important. En effet, des cultures obtenues à 30° en eau peptonée glucosée (peptone Chapoteaut 10 p. 1.000, glucose 20 p. 1.000), amenée à $pH = 7,5$ avec une solution diluée de soude et stérilisée à 115° pendant 20 minutes, ont donné une réaction de LEMOIGNE toujours négative avec *B. tumefaciens* H.; mais déjà après 15 jours et surtout après trois semaines, celle-ci était nettement positive avec *B. tumefaciens* Ant., alors que, dans les mêmes conditions, les deux variétés ensemencées en eau peptonée

pancréatique de pansees ne donnaient pas d'acétylméthylcarbinol. On voit donc ici, comme l'a déjà maintes fois signalé A. BERTHELOT, l'importance qu'il faut apporter au choix des peptones en bactériologie.

De plus, je n'ai jamais obtenu que des réactions faiblement positives en utilisant une souche de *B. lactis aerogenes* conservée depuis plusieurs mois au laboratoire. Avec la même souche, mais ayant subi des passages fréquents et répétés sur gélose glucosée, la production d'acétylméthylcarbinol était plus abondante et plus précoce. J'ai donc essayé de voir si je ne pourrais pas obtenir un résultat analogue avec *B. tumefaciens* H. et Ant. En effet, par ensemencement des milieux avec des cultures repiquées plusieurs fois en eau peptonée glucosée, la nature du phénomène n'était pas changée, mais accentuée. Dans ce cas je n'ai jamais obtenu de réaction de LEMOIGNE positive avec des cultures de *B. tumefaciens* H. en eau peptonée glucosée Chapoteaut. Mais *B. tumefaciens* Ant. présentait une réaction de LEMOIGNE faiblement positive, dès le cinquième jour à 30°, et fortement positive après trois semaines.

Les mêmes recherches ont été effectuées en milieu synthétique glucosé additionné d'une solution tampon de phosphates. Même après plusieurs passages sur ce milieu, ni *B. tumefaciens* H., ni la variété Ant. ne m'ont donné une réaction positive.

Alors que *B. tumefaciens* Ant. peut donc, dans certaines conditions de milieu et d'ensemencement, former de l'acétylméthylcarbinol à partir du glucose, il ne m'a pas été donné d'observer si *B. tumefaciens* H. possède le même pouvoir. Mais il me semble qu'on ne peut pas conclure à une propriété biochimique différente des deux variétés. En effet, puisqu'il a fallu prendre certaines précautions avant d'obtenir un résultat positif avec *B. tumefaciens* Ant., on peut espérer que d'autres conditions de développement permettront la production d'acétylméthylcarbinol avec la variété H.

Peut-être y a-t-il là une question de milieu à déterminer, ou bien un phénomène analogue à celui déjà observé dans bien des cas (A. BERTHELOT [9], F. G. VALLE MIRANDA [197], M. SCHOEN [164]). Peut-être faut-il, pour que *B. tumefaciens* H. retrouve la propriété de former de l'acétylméthylcarbinol, un nombre de passages en eau peptonée glucosée beaucoup plus grand que celui nécessaire à *B. tumefaciens* Ant.

II. — ACTION SUR LE GLUCOSE EN MILIEU SYNTHÉTIQUE. — J'ai employé le milieu synthétique suivant :

Eau distillée	1.000 g.
$\text{PO}^4\text{H}^2\text{K}$	0,5
SO^4Mg crist.	0,25
$\text{SO}^4 (\text{NH}^4)^2$	0,20
SO^4Fe , $\text{SO}^4 (\text{NH}^4)^2$, $6\text{H}^2\text{O}$. . .	~ 0,05
Glucose	20

amené à $\text{pH} = 7$ avec une solution de soude diluée (Ce milieu m'a servi à étudier l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les glucides autres que le saccharose). La solution obtenue était répartie par 1.500 centimètres cubes en matras de deux litres et stérilisée par chauffage à 113° pendant 20 minutes.

Les deux variétés H. et Ant. présentent sur ces milieux les caractères de culture qui ont été indiqués dans la première partie de ce travail.

Voici, notés après divers temps d'incubation, les pH des cultures obtenues et l'acidité correspondante, déterminée à l'aide d'une solution de soude titrée, et indiquée en acide acétique.

Variété	36 heures		3 jours		6 jours		8 jours		16 jours
	pH	acidité acétique p. 1000	pH	acidité acétique p. 1000	pH	acidité acétique p. 1000	pH	acidité acétique p. 1000	
H. . .	6,3	0,270	5,8	0,300	5,6	0,324	5,4	0,300	4,6
Ant. .	6,6	0,222	6,4	0,267	5,8	0,304	5,8	0,276	4,7

Des dosages de sucre effectués par la méthode de BERTRAND sur des cultures de 16 jours déféquées avec le réactif de PATEIN, ont permis d'établir les quantités de glucose consommé par les deux variétés. La proportion trouvée n'était que de 1,2 p. 1.000 avec la variété Ant., alors que, dans le même temps, le chiffre obtenu avec *B. tumefaciens* H. correspondait déjà à 3,4 p. 1.000 de glucose. L'attaque de ce glucide par cette variété est donc environ trois fois plus importante qu'avec *B. tumefaciens* Ant.

III. — RECHERCHE SPÉCIALE DE LA FORMATION D'ACIDE PYRUVIQUE AUX DÉPENS DU GLUCOSE. — Après 24 heures, 3 jours ou 10 jours à 30°, les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. en milieu simple A. M. C., ont toujours donné une réaction de SIMON négative [168]. Celle-ci était obtenue en ajoutant XV gouttes du réactif d'IMBERT et BONNAMOUR, puis 2 ou 3 centimètres cubes d'ammoniaque, à 5 centimètres cubes de liquide.

En présence de ces résultats, mettant à profit les faits observés par FERNBACH et SCHOEN [76] à propos de la formation d'acide pyruvique dans la fermentation alcoolique, j'ai étudié les cultures obtenues dans ce même milieu synthétique glucosé, mais, cette fois, en présence de carbonate de calcium, afin que, si de l'acide pyruvique se formait, il fût immédiatement fixé à l'état de sel calcique, et pût ainsi échapper à une destruction possible par la bactérie. Mais, même dans des cultures effectuées en présence de CO_2Ca , la réaction de SIMON, pratiquée à titre d'indication avant tout essai d'extraction, s'est toujours montrée négative, pour les deux variétés, après 24 heures, 3 jours et 10 jours de développement à 30°.

Dans ces conditions d'expérience, *B. tumefaciens* H. et Ant. ne peuvent donc produire de l'acide pyruvique aux dépens du glucose.

IV. — RECHERCHE DES PRODUITS D'OXYDATION DU GLUCOSE. — *B. tumefaciens* H. et Ant. étant essentiellement aérobies,

M. le Prof. G. BERTRAND a bien voulu me conseiller d'étudier tout spécialement la formation des produits d'oxydation de plusieurs glucides et particulièrement du glucose.

Dans son mémorable travail sur la Bactérie du Sorbose G. BERTRAND [35] avait exposé qu'il devait y avoir quatre processus de transformation biologique du glucose :

1° Oxydation de la fonction aldéhydique du glucose avec formation d'acide gluconique $\text{CH}^2\text{OH} - (\text{CHOH})^4 - \text{COOH}$. Quelques fois même, et c'est ce qu'a montré G. BERTRAND avec la bactérie du sorbose, la transformation est quantitative. En outre, lorsqu'il n'y a plus de glucose, lorsqu'il ne reste plus que de l'acide gluconique, le milieu de culture a perdu son pouvoir réducteur. Le microbe peut alors agir sur l'acide gluconique formé, le transformer en acide oxygluconique $\text{CH}^2\text{OH} - \text{CO} - (\text{CHOH})^3 - \text{COOH}$ par oxydation du groupement alcoolique secondaire voisin du groupement alcoolique primaire, et le milieu réduit à nouveau la liqueur cupro-potassique.

2° Formation d'acide glycuronique $\text{CHO} - (\text{CHOH})^4 - \text{COOH}$, par oxydation des deux groupements terminaux.

3° Dans d'autres cas la destruction va plus loin et il se forme de l'alcool.

4° Enfin le glucose peut être transformé en acide lactique. M. BERTRAND [35] a montré que « ces quatre processus correspondaient à des circonstances différentes ; les deux premiers sont essentiellement aérobies et supposent l'apport d'oxygène ; les deux derniers s'accomplissent sans le concours direct de cet élément ».

Il était donc intéressant de chercher par lequel de ces processus *B. tumefaciens* H. et Ant. détruisent le glucose.

Milieux utilisés. — Je me suis servie, soit du milieu synthétique indiqué au chapitre de l'action sur le glucose, soit d'une eau de levure préparée suivant la technique de G. BERTRAND [41]. Les milieux étaient répartis par 1.500 centimètres cubes dans des matras de FERNBACH afin de favoriser la for-

mation des phénomènes d'oxydation en offrant une large surface de contact entre l'air et le liquide. La stérilisation était effectuée par chauffage de 20 minutes à 115° et les matras ensemencés à l'aide de cultures obtenues dans le même milieu synthétique ou la même eau de levure.

Dès les premières vingt-quatre heures *B. tumefaciens* H. occasionnait un trouble léger du milieu et *B. tumefaciens* Ant. se développait sous forme de filaments flottant dans le liquide. La réaction des cultures était déterminée régulièrement afin de choisir, pour la recherche des acides formés, le moment où l'acide des cultures semblait avoir atteint son maximum. L'acidification était d'ailleurs plus précoce avec la variété H. ; mais après dix ou quinze jours de développement à 30° les différences de pH entre les deux variétés restaient faibles.

Recherche de l'acide gluconique. — Celle-ci était effectuée selon la technique indiquée par G. BERTRAND dans son étude biochimique de la bactérie du sorbose [35]. Les cultures et le milieu témoin étaient d'abord filtrés sur « carton mou » Durieux, puis soumises à l'ébullition pendant 15 minutes avec du carbonate de calcium pur. Le liquide était filtré, puis soumis à nouveau quelques instants à l'ébullition [130] et après nouvelle filtration, évaporé dans le vide jusqu'à réduction à un volume de 15 à 20 centimètres cubes. La solution concentrée était alors additionnée d'un grand volume d'alcool redistillé. Il se formait un trouble léger dans les liquides correspondant aux deux variétés H. et Ant., trouble environ deux fois plus important avec *B. tumefaciens* Ant. qu'avec *B. tumefaciens* H. Mais ces dépôts étaient tellement faibles qu'il était impossible d'essayer de les recristalliser et d'y doser le calcium afin de s'assurer que le calcium dosé sur le précipité correspondait bien au calcium calculé d'après la formule du gluconate de calcium.

J'ai recommencé plusieurs fois ces expériences. Les troubles obtenus après précipitation par l'alcool ont toujours été

aussi faibles, avec des cultures soit de huit jours à 30°, soit de quinze jours à la même température.

J'ai alors essayé d'utiliser de l'eau de levure, milieu beaucoup plus complexe, mais dans lequel les éléments minéraux capables de donner des composés calciques insolubles étaient moins abondants ; je me plaçais ainsi dans des conditions analogues à celles réalisées par G. BERTRAND [35].

L'eau de levure, amenée à $pH = 6,8$, était également répartie en matras de FERNBACH, par 1.500 centimètres cubes de liquide. Les deux variétés H. et Ant. présentaient sur ces milieux leur aspect habituel.

Le pH du témoin étant égal à 6,5 on pouvait noter d'abord une légère alcalinisation du milieu, plus nette avec *B. tumefaciens* Ant. dont le pH de la culture, au cinquième jour, était égal à 7,2. Après trois semaines à 30°, la réaction est légèrement acide. En effet, le pH des cultures de *B. tumefaciens* H. est alors égal à 6,0 ; mais celui de la variété Ant. présente la même valeur que celle du témoin. D'ailleurs, j'ai pu vérifier que les quantités d'acides volatils formés sont elles-mêmes très faibles, particulièrement pour la variété H.

De même qu'en milieu synthétique, et peut-être plus difficilement encore dans ce cas, je n'ai pu déceler la formation nette d'acide gluconique. Bien entendu, pour toutes ces recherches, dans les examens microscopiques et les essais de calcination, j'ai toujours comparé avec du gluconate de calcium pur les divers précipités calciques obtenus.

Malgré l'absence de formation d'acide gluconique par les deux variétés H. et Ant. dans les conditions de culture indiquées, j'ai essayé d'étudier si *B. tumefaciens* H. et Ant. pouvaient oxyder l'acide gluconique, non pas produit dans les cultures à partir du glucose, mais introduit dans les milieux sous forme de gluconate de calcium, et former de l'acide oxygluconique (BOUTROUX) [54].

J'ai donc remplacé le glucose dans le milieu synthétique utilisé par 25 p. 1.000 de gluconate de calcium pur. La solu-

tion minérale, amenée à $pH = 7$ avec une liqueur de soude diluée, se trouble et s'acidifie par addition de gluconate. Après ébullition avec du carbonate de calcium, puis filtration, le milieu était réparti en matras de FERNBACH et stérilisé à 115° pendant 20 minutes.

J'ai pu obtenir ainsi un développement abondant des deux variétés H. et Ant. Après deux mois et demi de séjour à 25° , le milieu ensemencé avec *B. tumefaciens* H. était nettement trouble et très visqueux. On pouvait remarquer à la surface du liquide, et surtout contre les parois des matras de FERNBACH, la présence de nombreux petits cristaux, beaucoup plus abondants avec la variété H. pour laquelle on en trouvait même dans les voiles bactériens. Ces cristaux examinés au microscope se montraient nettement biréfringents. Ceux obtenus avec *B. tumefaciens* Ant. avaient des arêtes vives. Probablement à cause de la grande viscosité du liquide dans lequel ils avaient pris naissance, ceux obtenus dans les cultures de *B. tumefaciens* H. étaient de même forme, mais à angles beaucoup moins nets. Un premier examen microscopique à l'aide d'un fort grossissement m'avait incitée à trouver quelques ressemblances entre ces cristaux et ceux d'oxygluconate décrits par M. G. BERTRAND. A partir d'un litre de culture de *B. tumefaciens* H., dans le même milieu, j'ai pu récolter 0 g. 07 environ de petits cristaux, insolubles dans l'eau et dans l'alcool, brunissant et décrépitant lorsque je les chauffais sur une lame de platine. Les cultures ne présentaient aucun pouvoir réducteur ; ce fait pouvait provenir de ce que tout l'acide oxygluconique élaboré aurait été transformé en oxygluconate de calcium insoluble.

J'ai donc traité ces cristaux par une solution très diluée d'acide nitrique ; ils s'y dissolvaient avec une vive effervescence. Après élimination de la chaux et alcalinisation, la liqueur obtenue ne présentait également aucun pouvoir réducteur. J'ai alors constaté que les cristaux disparaissaient, mais plus lentement, dans une liqueur d'acide acéti-

que au cinquième. Il était vraisemblable qu'il s'agissait de carbonate de calcium. Sur une petite quantité de ces cristaux dissous dans l'acide nitrique, j'ai vérifié que la base était bien de la chaux. J'ai alors essayé de caractériser la forme cristalline du carbonate de calcium à laquelle ils correspondaient.

En traitant les cristaux par une solution diluée de rouge Congo, quelques-uns se coloraient en rose alors que le plus grand nombre restaient incolores. Soumis à l'ébullition avec une solution de nitrate de cobalt, ils ne se sont pas colorés en lilas. Ces réactions montrent qu'il s'agit de cristaux de calcite mêlés d'une faible proportion de cristaux d'aragonite.

D'ailleurs, au microscope à faible grossissement, en lumière polarisée ou avec un fort éclairage latéral, un grand nombre de cristaux présentaient, en effet, l'apparence de petits rhomboèdres très brillants et biréfringents.

J'ai dosé le calcium dans les cristaux fournis par *B. tumefaciens* H. en milieu synthétique additionné de gluconate de calcium et j'ai trouvé les chiffres suivants :

Poids de substance analysée	Ca trouvé	Ca calculé pour CO_3Ca
0 g. 0362	0 g. 0134	0 g. 0144

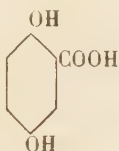
Ces résultats montrent donc bien qu'il s'agissait de cristaux de carbonate de calcium.

Recherche de l'acide glycuronique. — Cette recherche a été effectuée d'une part en se servant de la réaction de LEGAL et d'autre part à l'aide de la naphto-résorcine. Cinq centimètres cubes de liquide additionnés de 0 cm³ 5 d'une solution alcoolique à 10 p. 100 de naphto-résorcine et de 5 centimètres cubes d'acide chlorhydrique, sont mis à chauffer dans des tubes placés un quart d'heure dans un bain-marie bouillant. L'acide glycuronique se reconnaît par l'apparition d'une coloration violette.

Cette recherche a toujours donné un résultat négatif lorsqu'elle a été pratiquée sur les cultures des deux variétés H.

et Ant., alors qu'elle se montrait positive lorsqu'on l'effectuait sur un témoin contenant des traces d'acide glycuronique obtenu par l'hydrolyse de l'acide euxanthique du jaune indien (BERNIER) [5].

Recherche de l'acide 2-5-dioxybenzoïque (acide gentisique). — H. RAISTRICK et P. SIMONART [153], en 1933, ont indiqué un nouveau produit résultant du métabolisme du glucose par *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx, l'acide 2-5-dioxybenzoïque appelé aussi acide gentisique



Cet acide est caractérisé par la coloration bleue qu'il communique à une solution diluée de perchlorure de fer. Cette réaction, opérée sur les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant., s'est toujours montrée négative.

Arabinose.

Après avoir essayé de caractériser certains produits de l'oxydation du glucose par *B. tumefaciens* H. et Ant., j'ai étudié l'action de ces deux variétés sur l'arabinose, à l'aide d'un milieu semblable et d'une même technique.

Après 18 jours à 30°, les cultures obtenues présentaient un *pH* nettement acide et égal à 4,8. J'ai dosé cette acidité avec une solution titrée de soude et déterminé la quantité de glucide consommé par la méthode de dosage de G. BERTRAND [41], après défécation au réactif de PATEIN. Les chiffres obtenus sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Témoin	Acidité en acide acétique	Sucre consommé
Témoin.	0,240	—
H.	0,336	4,40
Ant.	0,300	4,12

Dans les cultures obtenues soit avec le milieu synthétique, soit en eau de levure, je me suis attachée à déceler la formation d'acide arabonique selon la méthode indiquée par G. BERTRAND [35] dans son étude sur la bactérie du sorbose. L'arabonate de calcium était recherché exactement à l'aide de la technique employée pour mettre en évidence, à l'état de gluconate de calcium, l'acide gluconique éventuellement formé. Je n'indiquerai donc ici que les résultats de ces recherches.

Les précipitations par l'alcool des solutions concentrées provenant des cultures sur milieu synthétique n'ont jamais donné qu'un louche à peine sensible, aussi important pour le témoin que pour les variétés H. et Ant. D'ailleurs, l'examen de ce précipité, soit au microscope, soit par calcination, indiquait qu'il était essentiellement constitué par des traces de sulfate de calcium provenant des sulfates introduits en très faibles quantités dans le milieu.

Par contre, les mêmes précipitations effectuées sur les solutions concentrées provenant des cultures en eau de levure ont provoqué la formation d'un louche très net dans le cas de la variété H., beaucoup plus faible pour la variété Ant., enfin, très lent à se former et à peine appréciable dans le tube correspondant au milieu témoin. Après 48 heures les dépôts ont été repris par l'eau et additionnés à nouveau d'un volume plus faible d'alcool. Le liquide correspondant à la variété H. a donné, une fois encore, un précipité assez abondant alors qu'avec ceux de la variété Ant. et du témoin le précipité était à peine perceptible.

J'ai comparé le produit obtenu à partir des cultures de *B. tumefaciens* H. avec de l'arabonate de calcium préparé en oxydant l'arabinose à basse température par l'acide azotique de densité 1,2 selon la méthode de KILIANI. Cet arabonate de calcium, trois fois recristallisé, et caractérisé par la formation de la phénylhydrazone (FISCHER), se présentait à l'examen microscopique sous forme de fines aiguilles tout à

fait typiques. Il a été comparé au microscope, et par calcination sur une lame de platine, avec le très léger précipité obtenu à partir des cultures de la variété H. De ce que j'ai constaté il semble bien que je puisse conclure que ce précipité ne contient pas trace de matière organique et qu'il est surtout constitué par du sulfate de calcium.

Fructose.

Après avoir étudié les produits de l'oxydation de deux aldoses par *B. tumefaciens* H. et Ant., j'ai examiné au même point de vue l'action des deux variétés sur un cétose, le l-fructose.

Le milieu synthétique employé et la dose de glucide ajoutée ont été les mêmes que dans les deux cas précédents.

Après 10 jours à 30° les deux variétés avaient produit une acidification du milieu dont le pH était passé de la valeur 7 à la valeur 6,2 dans le cas de *B. tumefaciens* Ant., et même 5,0 avec *B. tumefaciens* H.

L'acidité correspondante et la quantité de glucide consommé sont indiquées dans le tableau suivant :

	Acidité en acide acétique	Sucre consommé
Témoin.	0,246	—
H.	0,320	2,0
Ant.	0,270	0,9

On peut donc déduire que les deux variétés H. et Ant. attaquent le fructose avec des vitesses très différentes dont l'une, correspondant à la variété H., est double de l'autre. Ceci confirme la remarque déjà faite que *B. tumefaciens* H. présente une activité plus grande vis-à-vis des glucides.

Les cultures obtenues sur ces milieux sont peu riches en acides volatils, particulièrement celles obtenues après ensemencement avec la variété H.

Bien que les composés suivants ne se forment que par oxy-

dation énergétique du fructose, j'ai recherché spécialement les acides tartrique, oxalique et glycolique.

Recherche de l'acide tartrique. — Les cultures obtenues en eau de levure additionnée de 20 p. 1.000 de fructose, et dont la réaction était neutre au tournesol, étaient filtrées, puis distillées dans le vide jusqu'à réduction au 1/10 de leur volume initial. Les liquides, résidus de la distillation, étaient acidifiés nettement par de l'acide phosphorique et précipités par dix fois leur volume d'alcool. Les liqueurs alcooliques séparées des précipités après repos de 24 heures à la température du laboratoire, étaient concentrées dans le vide et reprises par un faible volume d'eau (liqueurs A).

J'ai effectué alors la recherche de l'acide tartrique selon la technique indiquée par G. BERTRAND [41], soit par la réaction à la résorcine, soit par l'essai de formation du bitartrate de potassium. Dans aucun cas je n'ai obtenu ni de coloration rose, ni de cristaux caractéristiques. *B. tumefaciens* H. et Ant. n'avaient donc pu, dans les conditions de culture réalisées, transformer le fructose en acide tartrique.

Recherche de l'acide oxalique. — Par addition d'une solution de chlorure de calcium aux liqueurs A (témoin, H. et Ant.) amenées à neutralité avec de l'ammoniaque diluée, il ne s'est jamais produit qu'un louche disparaissant complètement par addition de quelques gouttes d'acide acétique dilué. Il n'y avait pas eu formation d'acide oxalique dans les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant.

Recherche de l'acide glycolique (BLANCHETIÈRE [44, p. 36]). — J'ai recherché la présence d'acide glycolique dans les liqueurs A en appliquant la réaction de DENIGÈS employée par BLANCHETIÈRE dans des essais analogues. J'ai recueilli dans un tube refroidi les vapeurs qui se dégageaient par chauffage de ces solutions avec l'oxyde de plomb (oxyde puce). Les réactions de NESSLER, de LEGAL, et la réduction du sulfate mercurique, opérées sur les portions de liquides dis-

tillés, se montrèrent également négatives dans tous les cas. Il n'y avait donc pas de méthanal, et, par suite, pas d'acide glycolique dans les liqueurs.

Saccharose.

Si la recherche des produits provenant de l'oxydation du glucose ou du fructose avait permis de montrer la formation nette d'un produit caractéristique par l'une au moins des deux variétés, il aurait été intéressant d'étudier si *B. tumefaciens* H. et Ant. pouvaient fournir ce même composé par dédoublement du saccharose. Les résultats s'étant montrés négatifs il m'a semblé inutile de m'attacher à cette étude et, utilisant un milieu synthétique très simple, le milieu S. G. déjà indiqué et additionné de 30 p. 1.000 de saccharose, j'ai simplement noté l'acidité des cultures, leur pouvoir réducteur et leur pouvoir rotatoire. De plus, j'ai essayé d'établir si les deux variétés H. et Ant. pouvaient former de l'acétylméthylcarbinol sur milieu synthétique additionné de saccharose. De même qu'en milieu glucosé, les résultats ont été négatifs.

Après 15 jours à 30° les cultures réduisaient nettement la liqueur cupro-potassique. Je les ai analysées à l'aide de la méthode par réduction indiquée par G. BERTRAND [41] pour le dosage d'un mélange de saccharose et de sucre interverti.

J'ai fait deux séries de dosages : les premiers, avant inversion, pour déterminer la quantité de sucre interverti produit par les bactéries ; les seconds, après inversion, pour doser le sucre total des cultures (sucre interverti formé et saccharose non attaqué). J'ai obtenu les résultats suivants :

	Saccharose présent par litre	Sucre interverti par litre
Témoin.	27,93	1,92
H.	12,27	10,25
Ant.	11,16	8,17

On peut en déduire les quantités de saccharose consommé par les deux variétés de *B. tumefaciens*.

	Saccharose consommé par litre de milieu	Proportion de saccharose consommé p. 100
H.	15,16	54,2
Ant.	16,77	60,4

La petite quantité de sucre interverti dosée dans le témoin est due vraisemblablement à l'action de l'eau et des constituants du milieu sur le saccharose, sous l'influence de la température élevée de la stérilisation et du séjour prolongé à 30°. Sous réserve qu'il faudrait en tenir compte dans les calculs et puisqu'il s'agit d'une comparaison entre les deux variétés H. et Ant., il semble qu'il soit pratiquement suffisant de noter, d'une part que *B. tumefaciens* H. possède le pouvoir de transformer plus facilement le saccharose en sucre interverti, et d'autre part, que la quantité de saccharose consommé est plus importante avec la variété Ant.

J'avais déterminé le pouvoir rotatoire des cultures avec l'intention d'appliquer des formules courantes et de calculer, en tenant compte des pouvoirs réducteurs avant et après hydrolyse, les proportions respectives du saccharose, du glucose, du fructose, qui existent dans les cultures. Mais, outre ces glucides, celles-ci renferment d'autres produits possédant un pouvoir réducteur ou un pouvoir rotatoire qui rendent les résultats inutilisables pour l'application de ces formules. Les phénomènes sont donc trop complexes, les produits qui peuvent se former trop divers, pour que je puisse essayer de donner une explication simple de ces résultats.

Amidon.

J'ai étudié l'action des deux variétés H. et Ant. sur l'amidon et noté, après trois semaines de séjour à 30°, soit en milieu peptoné, soit en milieu synthétique, l'aspect de la culture, la réaction du milieu, et recherché s'il y avait apparition d'un pouvoir rotatoire. J'ai préparé le milieu suivant :

Eau distillée	4.000 g.
PO ⁴ H(NH ⁴) ²	0,5
PO ⁴ HK ²	0,5
SO ⁴ Mg crist.	0,5

Dans un faible volume de cette liqueur j'ai délayé à froid 15 grammes de fécule de pomme de terre et j'ai versé le tout, en remuant sans cesse, dans le reste de la solution nutritive chaude. L'empois obtenu était réparti dans des fioles coniques en Pyrex, soit tel que, soit après addition de 15 p. 1.000 de peptone pancréatique de panses, et stérilisé à 115° pendant 20 minutes.

En milieu synthétique, le développement était extrêmement faible, et, après trois semaines de séjour à 30° la consistance de l'empois ne s'était en rien modifiée. Le pH, égal à 6,6, était le même qu'après stérilisation.

Au contraire, en présence de peptone, l'attaque de l'amidon était très nette. Après quatre jours à 30°, *B. tumefaciens* H. commençait à liquéfier légèrement le milieu. Les deux empois étaient devenus presque complètement fluides au bout de la première quinzaine et avaient pris une coloration brune. Mais ces milieux ne réduisaient pas la liqueur cupro-potassique même à chaud. Après trois semaines, le pH est passé de 6 à 7, tant pour la variété H. que pour la variété Ant.

A l'aide de la technique et des réactifs employés dans l'étude des cultures en eau peptonée glucosée j'ai cherché à caractériser, d'une part la présence de composés aldéhydiques, alcooliques et cétoniques, d'autre part celle des acides volatils et des acides fixes. J'ai pu constater qu'il ne

se formait dans ces conditions ni acétone, ni alcool, même en concentrant par une nouvelle distillation le liquide tout d'abord obtenu. Au contraire, on pouvait affirmer la présence d'aldéhydes. Les acides volatils formés étaient si peu abondants qu'il était difficile de les caractériser à l'aide de la distillation de DUCLAUX ; la recherche de l'acide acétique par la formation du cacodyle montrait, d'ailleurs, qu'il ne s'en était formé qu'en très faible quantité.

Sur les cultures, et en me servant des techniques déjà indiquées, j'ai recherché les acides oxalique et lactique. Les résultats ont été négatifs.

Après clarification des liqueurs par formation d'un précipité de phosphate calcique, centrifugation, puis filtration sur papier imprégné de terre d'infusoires, j'ai déterminé le pouvoir réducteur sur une faible portion de liquide. Il correspondait, pour les deux variétés, à 1 p. 1.000, calculé en maltose. Avant d'entreprendre des essais de défécation et de détermination quantitative, j'ai traité par l'acétate de phénylhydrazine une certaine quantité de chacun des liquides concentrés au bain-marie. Bien que j'aie opéré sur des liqueurs correspondant à 200 centimètres cubes de cultures j'ai obtenu, aussi bien pour la variété H. que pour la variété Ant., des traces d'un précipité qui, examiné au microscope, s'est montré constitué de longues lamelles jaunes plus ou moins brisées ou déformées et de sortes de rosettes, très irrégulières, résultant du groupement de longs cristaux lamellaires autour d'un centre. Bien entendu ce produit était très impur, mais il existait en si faible quantité qu'il était inutile d'essayer de le recristalliser et d'en prendre un point de fusion. Il semble bien que j'ai eu affaire à de la maltosazone, mais, en tout cas, sa proportion ne correspondait nullement à ce qu'indiquait le pouvoir réducteur.

L'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur l'amidon, dans les conditions où je me suis placée, est donc insignifiante.

B. — ACTION SUR LES ALCOOLS PLURIVALENTS

G. BERTRAND a montré [35] que la bactérie du sorbose se développait très inégalement sur de l'eau de levure additionnée de divers polyalcools. Pour que l'attaque soit possible il faut que l'alcool renferme dans sa molécule un groupement alcoolique secondaire. Et de plus, c'est « seulement lorsque l'oxhydrile OH de ce groupement est disposé de telle façon que d'un même côté de la chaîne, il ne soit pas au voisinage d'un atome d'hydrogène faisant partie d'un groupement semblable qu'on observe l'attaque par la bactérie ». C'était le cas du glycérol, du mannitol et du sorbitol, polyalcools spécialement attaqués par la bactérie du sorbose.

J'ai donc simplement essayé de déterminer si les deux variétés de *B. tumefaciens* pouvaient produire la fermentation de ces trois polyalcools, du glycérol tout particulièrement.

Glycérol.

Le milieu utilisé était le même que celui employé ci-dessus dans mes recherches sur le saccharose, mais additionné de 50 p. 1.000 de glycérol. La stérilisation était effectuée par chauffage à 115° pendant 20 minutes. Les cultures étaient très nettes dès le cinquième jour à 30°.

J'ai déterminé, après trois semaines d'incubation à cette même température, la réaction des milieux et leur acidité correspondante.

	pH du milieu	Acidité en ac. acétique
Témoin . . .	7,3	0,171
H.	7,0	0,318
Ant.	7,0	0,289

Ainsi que l'a montré G. BERTRAND [35] dans son étude sur la formation de la dioxyacétone par la bactérie du sorbose,

l'oxydation du glycérol peut donner un grand nombre de produits, spécialement la dioxyacétone $\text{CH}^2\text{OH} - \text{CO} - \text{CH}^2\text{OH}$; et l'aldéhyde glycérique $\text{CH}^2\text{OH} - \text{CHOH} - \text{CHO}$. Or, après trois semaines ou cinq mois, les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. obtenues en milieu synthétique additionné de glycérol ne possédaient pas le pouvoir de réduire la solution cuivrique à froid. Elles ne contenaient donc ni dioxyacétone, ni aldéhyde glycérique, ni méthylglyoxal $\text{CH}^3 - \text{CO} - \text{CHO}$.

De plus, j'ai recherché la formation d'acétylméthylcarbinol $\text{CH}^3 - \text{CO} - \text{CHOH} - \text{CH}^3$ en opérant la réaction de LEMOIGNE (formation de nickel-diméthylglyoxime) sur les premiers centimètres cubes provenant de la distillation directe des cultures avec du perchlorure de fer. Les résultats se sont toujours montrés négatifs. Mais, en opérant la transformation de l'acétylméthylcarbinol en biacétyl par le chlorure ferrique, non sur les cultures elles-mêmes mais sur les premiers centimètres cubes recueillis lors de la distillation qui permet de concentrer les composés volatils, j'ai pu obtenir une réaction de LEMOIGNE très faiblement positive avec *B. tumefaciens* Ant. (formation d'un très léger précipité rouge); avec la variété H., et dans les mêmes conditions, après chauffage, la liqueur s'est légèrement colorée en vert; mais je n'ai pu noter aucune trace de précipité de nickel-diméthylglyoxime.

Sur aucune des liqueurs recueillies à la distillation des cultures de *B. tumefaciens* H. ou Ant. je n'ai pu déceler la présence ni d'alcool, ni de cétone. Mais, et par la recoloration du réactif de SCHIFF, et par la réduction du nitrate d'argent ammoniacal à chaud, je pouvais caractériser la présence d'aldéhyde. La réaction de LEGAL qui donne une coloration rouge après addition d'acide acétique lorsqu'on se trouve en présence d'éthanal a permis de noter que, seule, la variété Ant. pouvait en former dans ces cultures, mais en proportion très faible.

Enfin, les recherches des acides volatils et des acides fixes se sont montrées négatives.

Après sept mois de développement à 30°, les milieux ensemençés avec *B. tumefaciens* H. et Ant. présentaient un pH égal à 5,0. Les mêmes recherches que celles indiquées ci-dessus ont été effectuées. Des réactions opérées, on peut conclure que, dans ces conditions d'expérience, il y a formation d'aldéhyde, comme dans les cultures examinées après trois semaines de séjour à 30°. Mais je n'ai pu déceler, même à l'état de trace, aucune substance réductrice.

VOISENET [200] ayant montré que l'acroléine $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$ pouvait apparaître vers le quatrième jour dans des cultures de *B. amaracrylus* sur un milieu minéral glycérolé, soit sans peptone, soit additionné de 3 p. 1.000 de cette substance, j'ai examiné à partir du quatrième jour des cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. en milieu synthétique glycérolé. Pour effectuer cette recherche j'ai préparé de la façon suivante le réactif protéique acide de VOISENET [199]. D'une part, à 200 centimètres cubes d'acide chlorhydrique pur j'ajoutais 0 cm³ 1 d'une solution de nitrite de potassium pur à 3,6 p. 100. D'autre part, un blanc d'œuf était additionné de 5 à 7 centimètres cubes d'eau distillée, battu énergiquement et filtré sur toile. Cinq centimètres cubes de la solution étudiée, placés dans un tube, étaient alors additionnés de 1 centimètre cube de liqueur albumineuse, puis de 18 centimètres cubes d'acide chlorhydrique nitreux. J'agitais pour redissoudre l'albumine et je chauffais au bain-marie à 50°. La présence d'acroléine se reconnaît à l'apparition d'une coloration d'abord verte, puis bleue. Comme l'indique VOISENET j'opérais la recherche de cet aldéhyde directement sur les cultures dont le pH était égal à 7. La réaction a toujours été négative, alors qu'un témoin additionné d'une faible quantité d'acroléine donnait un résultat positif.

Dans ces conditions d'expérience, *B. tumefaciens* H. et Ant. ne peuvent donc transformer le glycérol en acroléine.

Mannitol et sorbitol.

En 1897, VINCENT et DELACHANAL [197 *b*] avaient pu obtenir par un processus bactérien la formation d'un cétose, le fructose à partir du mannitol. En 1904, G. BERTRAND [35] montrait que la bactérie du sorbose attaquait le sorbitol isomère du mannitol et, par oxydation, donnait également un cétose, le sorbose.

Malgré les résultats obtenus avec le glycérol j'ai étudié également l'action des deux variétés H. et Ant. sur le mannitol et le sorbitol.

J'ai utilisé le milieu synthétique qui m'a déjà servi à déterminer l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les glucides. Le polyalcool y était introduit à la dose de 20 p. 1.000 et les solutions, réparties par 100 centimètres cubes en biberons de Pyrex de 250 centimètres cubes, étaient stérilisées à 115° pendant 20 minutes. Pour favoriser les phénomènes d'oxydation, les biberons ont été maintenus inclinés pendant tout le séjour à l'étuve.

B. tumefaciens H. et Ant. donnent des cultures abondantes en présence soit de mannitol, soit de sorbitol. Mais, après un mois de séjour à 30°, les milieux ne réduisaient pas la liqueur cupro-potassique. Ces bactéries ne présentent donc aucun point de ressemblance avec la bactérie du sorbose.

C. — ACTION SUR L'ACIDE PYRUVIQUE

A. BERTHELOT [13 *b*] et Mlle E. OSSART [140] ont signalé les premiers, en cultivant deux bacilles acétonogènes aérobies en eau peptonée additionnée non de glucose, mais de pyruvate de sodium, qu'on peut obtenir de l'acétylméthylcarbinol par action directe de certaines bactéries sur l'acide pyruvique.

J'ai borné l'étude biochimique de l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les acides gras à cette recherche. Le milieu utilisé correspondait à la composition suivante :

Eau distillée	1.000 g.
PO ⁴ H ² K	3
SO ⁴ Mg crist.	1
SO ⁴ (NH ⁴) ²	1
Pyruvate de sodium	20
Acide pyruvique	1

Cette solution était amenée à pH = 6,8 avec de l'ammoniaque diluée et répartie en biberons de Pyrex de 250 centimètres cubes par portions de 125 centimètres cubes. La stérilisation était effectuée à 110° pendant 25 minutes.

Après 48 heures à 30° les milieux ensemencés avec la variété H. présentaient un trouble uniforme alors que les cultures de *B. tumefaciens* Ant. étaient particulièrement grumeleuses.

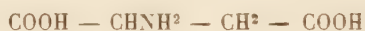
J'ai recherché la formation d'acétylméthylcarbinol sur les cultures obtenues après 11 jours à 30°. Celles-ci ne réduisaient pas d'une façon visible la liqueur cupro-potassique. Je les ai distillées. Les liquides recueillis étaient additionnés de perchlorure de fer, puis redistillés. Sur les quatre premiers centimètres cubes j'ai effectué la réaction de LEMOIGNE. Celle-ci, bien entendu, s'est montrée complètement négative avec le milieu-témoin, faiblement mais nettement positive dans le cas de la variété H., plus fortement positive avec la liqueur provenant d'une culture correspondante de *B. tumefaciens* Ant.

Ceci, d'une part, confirme les résultats faiblement positifs déjà obtenus indiquant que l'acétylméthylcarbinol pouvait être un des produits élaborés dans certaines conditions de milieu par *B. tumefaciens* H. et Ant. et, d'autre part, que cet acétylméthylcarbinol pouvait se former par action directe de certains microbes sur l'acide pyruvique.

CHAPITRE II

ACTION SUR CERTAINS COMPOSÉS AZOTÉS

J'avais remarqué en étudiant qualitativement l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les milieux additionnés d'acides aminés que l'acide aspartique gauche



et son amide l'asparagine gauche



permettaient d'obtenir des cultures très abondantes avec ces deux variétés. Or la l-asparagine se rencontre dans un grand nombre de plantes dont on peut aisément l'extraire (Asperge, Vesce, Pois, Betterave). *B. tumefaciens* étant un microbe pathogène pour les végétaux il m'a semblé que l'étude comparative de mes deux variétés sur l'asparagine et l'acide aspartique pouvait présenter quelque intérêt.

D'autre part, les auteurs qui ont publié des travaux sur *B. tumefaciens* ont généralement employé des milieux de culture à base de peptones. Il m'a semblé que, pour l'étude de l'action de mes deux variétés sur les produits azotés complexes, j'avais intérêt à choisir une peptone aussi dégradée que possible et riche en acides aminés. J'ai donc adopté la peptone pancréatique de panse « Defresne ». C'est au sujet des milieux préparés à l'aide de ce produit complexe que je vais indiquer la technique générale employée pour la séparation qualitative des composés formés et pour le dosage de certains d'entre eux.

A. — TECHNIQUE DE L'ÉTUDE QUALITATIVE

MILIEU UTILISÉ. — Je me suis servie d'une eau peptonée (p. pancréatique de panse à 20 p. 1.000), amenée à $\mu\text{H} = 7,2$ avec une solution de soude diluée, répartie par 1.250 centimètres cubes dans de grandes fioles coniques et stérilisée par un chauffage de 45 minutes à 115° . L'ensemencement avait été effectué largement à l'aide d'une culture de 48 heures, sur gélose, de l'une des deux variétés.

Après vérification de la pureté des cultures et de la stérilité du témoin, chaque milieu, après un temps d'incubation convenablement choisi, était ramené à son volume initial, puis filtré sur « carton mou » Durieux. La réaction des cultures, généralement alcaline, était notée soigneusement.

RECHERCHE DES COMPOSÉS ALCOOLIQUES, ALDÉHYDIQUES ET CÉTONIQUES VOLATILS. — Après avoir neutralisé une fraction de la culture, celle-ci était distillée par entraînement à la vapeur d'eau afin de recueillir les produits volatils. L'opération ne présentait pas de difficulté avec *B. tumefaciens* H., mais le liquide correspondant à la variété Ant. moussait beaucoup, même après addition de pierre ponce ou d'huile de vaseline. Le liquide obtenu était à nouveau distillé pour concentrer sous un plus faible volume les principes à mettre en évidence. La recherche de composés alcooliques, aldéhydiques et cétoniques a été pratiquée à l'aide des réactions indiquées dans le chapitre sur les produits élaborés aux dépens des composés ternaïres.

RECHERCHE DES ACIDES VOLATILS. — Celle-ci était effectuée sur des volumes égaux de milieu témoin ou de cultures additionnés de quantités égales d'acide sulfurique. Après distillation sous pression réduite et au bain-marie, les liquides recueillis servaient à déterminer les acides volatils soit à l'aide de la distillation de DUCLAUX, soit par recherche directe sur leurs sels de sodium.

RECHERCHE DES AMINES. — La technique que j'ai employée dans la recherche des amines s'inspire principalement des indications données par M. GUGGNEHEIM [89] et A. MOREL [133].

1° *Amines volatiles*. — Pour rechercher les amines volatiles (méthylamine, éthylamine, diéthylamine, diméthylamine, triméthylamine, et accessoirement butylamine et amylamine), j'ai distillé rapidement dans le vide au bain-marie les cultures et le témoin alcalinisés par un excès de magnésie calcinée. Le liquide recueilli était acidifié par de l'acide sulfurique ajouté sans excès. Les solutions de sulfates d'amines ainsi obtenues étaient concentrées presque à sec, et les résidus épuisés en les reprenant plusieurs fois par de l'alcool à 90° qui dissout les sulfates d'amines et laisse le sulfate d'ammonium insoluble. La solution alcoolique des sulfates d'amines était alors concentrée dans le vide à température peu élevée, puis reprise par l'eau. Enfin la liqueur ainsi obtenue me servait à rechercher les amines avec le réactif de NESSLER, la réaction de FRANÇOIS et celle de MAYER [89].

Avec le réactif de NESSLER, l'ammoniaque, suivant sa concentration dans les liqueurs, donne, soit une coloration jaune, soit un précipité brun. Les précipités obtenus sont rouge orangé avec la méthylamine, rouge-brun avec la diméthylamine, blanc avec l'éthylamine, et de couleur chocolat avec la propylamine.

Le réactif de FRANÇOIS se prépare en dissolvant 22 grammes, 7 de biiodure de mercure, 32 grammes d'iodure de potassium et 35 grammes de lessive de soude dans de l'eau distillée, puis en complétant le volume à un litre. Ce réactif ne précipite à froid ni la méthylamine, ni l'ammoniaque en solution étendue ; mais, si l'on chauffe lentement, jusqu'à ce qu'il se dégage de petites bulles gazeuses, l'ammoniaque, à partir d'une concentration de 0,2 p. 100 en ClNH_4 , détermine la formation d'un précipité brun-rouge.

Enfin le réactif de MAYER, obtenu en dissolvant 45 grammes de biiodure de mercure et 33 grammes d'iodure de potas-

sium dans 100 centimètres cubes de solution de soude normale, ne donne pas de précipité avec de l'ammoniaque, mais en forme avec les amines tertiaires (triméthyl et triéthylamines).

2° *Amines non volatiles*. — A part la butylamine et l'amylamine peu volatiles, ces amines sont surtout des bases cycliques et hétérocycliques; la p. oxyphényléthylamine, la 5-imidazoléthylamine et l'indoléthylamine, sont celles que l'on rencontre le plus fréquemment. J'ai alcalinisé avec de la soude 50 centimètres cubes de culture filtrée. Après une longue agitation avec 25 centimètres cubes de chloroforme, celui-ci a été séparé dans une petite boule à décantation, lavé une fois avec 25 centimètres cubes d'eau distillée et épuisé deux fois avec 25 centimètres cubes d'eau légèrement acidulée par de l'acide chlorhydrique.

Dans cette solution aqueuse je recherchais d'une part la présence de p. oxyphényléthylamine par la réaction de MILLON, d'autre part les composés de l'imidazol à l'aide de la réaction de PAULY (acide diazobenzènesulfonique en présence d'ammoniaque), enfin l'indoléthylamine par le réactif glyoxylique et le réactif d'EHRlich (p. diméthylaminobenzaldéhyde).

3° *Recherche de la choline*. — Pour rechercher spécialement la choline j'acidifiais très légèrement 25 centimètres cubes de culture avec de l'acide chlorhydrique dilué. Après addition de 250 centimètres cubes d'alcool à 96° le liquide était filtré, puis concentré au bain-marie. J'essayais alors de caractériser la choline par la formation des cristaux de FLORENCE en passant par les chloroplatinates, ainsi que l'a indiqué ROSENHEIM (cité par GUGGENHEIM) [89].

Je contrôlais mes réactifs à l'aide de milieux additionnés de traces de choline.

RECHERCHE DES ACIDES CYCLIQUES ET HÉTÉROCYCLIQUES. — Pour rechercher ces acides (et particulièrement les acides p-oxyphényl-acétique et propionique, imidazol-acétique et pro-

pionique, indol-acétique et propionique) j'effectuais les mêmes réactions que celles indiquées ci-dessus (réactions des groupements phénoliques, imidazoliques et indoliques) après extraction préalable de ces acides par addition d'acide sulfurique à 25 centimètres cubes de culture filtrée, épuisement par l'éther, et reprise par de l'eau alcalinisée très légèrement par de la soude.

De plus, pour la caractérisation spéciale de l'acide indol-acétique j'ai effectué la réaction de SALKOWSKY en ajoutant à la liqueur étudiée quelques gouttes de nitrite de sodium à $\frac{1}{300}$ et quelques centimètres cubes d'acide chlorhydrique. J'avais vérifié auparavant, comme je l'ai déjà indiqué, que ces cultures ne renfermaient pas d'indol libre.

La recherche des autres acides fixes a été effectuée selon la technique déjà indiquée (épuisement par l'éther des cultures acidifiées, débarrassées préalablement de leurs acides volatils ; puis évaporation de la solution éthérée et reprise du résidu par quelques centimètres cubes d'eau).

B. — DÉTERMINATIONS QUANTITATIVES

Sur les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant., soit en eau peptonée, soit en milieu synthétique additionné ou d'acide aspartique ou d'asparagine, j'ai dosé soit l'azote total des cultures (KJELDAHL), soit l'ensemble de l'azote aminé et de l'azote ammoniacal (SÖRENSEN) [191], l'azote ammoniacal seul (FOREMAN) [68], enfin, quand cela était possible la somme de l'azote des acides aminés et des polypeptides (MARTENS) [128].

Je vais d'abord indiquer les techniques que j'ai employées pour doser l'azote sous ces différentes formes dans mes cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant.

DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL par la méthode de KJELDAHL. — A 30 centimètres cubes de culture filtrée, j'ajoutais 5 centi-

mètres cubes d'acide sulfurique concentré et 11 gouttes de mercure. Je chauffais d'abord pour chasser l'eau de la culture ; puis, après nouvelle addition d'acide sulfurique, l'attaque était prolongée jusqu'à décoloration complète de la liqueur. Après refroidissement, j'ajoutais de faibles traces de permanganate de potassium. Enfin, la distillation de l'ammoniaque était effectuée selon la technique indiquée par G. BERTRAND.

DOSAGE DE L'AZOTE DES ACIDES AMINÉS ET DE L'AMMONIAQUE *par la méthode de SÖRENSEN* [191], *légèrement modifiée par J. FROIDEVAUX* '83] pour son application à des solutions contenant également de l'azote de « protides non touchés par les scissions protéolytiques ».

Je préparais d'abord une solution de soude N 5 dans l'eau distillée bouillie. D'autre part, 100 centimètres cubes de formol (aldéhyde formique à 40 p. 100 environ), étaient additionnés de 1 centimètre cube de solution alcoolique de phtaléine du phénol et de la solution de soude N 5 jusqu'à coloration rose très faible.

Cinq centimètres cubes, exactement mesurés, de culture filtrée étaient alors additionnés de 15 centimètres cubes d'eau distillée bouillie, et amenés à neutralité, en présence de 11 gouttes de phtaléine, par addition d'acide chlorhydrique N/5. J'ajoutais alors 20 centimètres cubes de formol neutralisé. Et le titrage était effectué par addition de la solution de soude jusqu'à l'obtention d'une teinte rose identique à celle présentée par une liqueur de contrôle contenant 30 centimètres cubes d'eau distillée bouillie, 20 centimètres cubes de formol neutralisé, et 11 gouttes de phtaléine.

J. FROIDEVAUX indique que les chiffres d'azote calculés d'après les résultats obtenus doivent être multipliés par le coefficient 1,04 pour fournir sensiblement la somme totale des deux formes d'azote aminé et ammoniacal.

DOSAGE DE L'AZOTE AMMONIACAL, *par la méthode de FOREMAN* [81]. — Ce dosage a été effectué en suivant le mode opératoire indiqué par S. W. COLE [63].

Lorsqu'on ajoute de la lessive de soude à une solution alcoolique très concentrée contenant de l'urée, des sels ammoniacaux, ou tout autre produit azoté, seul l'ammoniac des sels ammoniacaux est libéré rapidement et quantitativement.

L'appareil se composait d'un ballon à distiller de 1 litre dans lequel plongeait jusqu'au fond un tube légèrement coudé à la partie inférieure et en communication par l'autre extrémité avec une marmite en cuivre contenant de l'eau distillée bouillante dont l'ammoniac et CO_2 avaient été chassés par ébullition préalable de 10 minutes au moins. Le tube latéral du ballon à distiller était relié par un tube de verre à l'extrémité supérieure d'un réfrigérant vertical. Le liquide distillé était recueilli à la partie inférieure de ce réfrigérant, dans un verre contenant 5 centimètres cubes d'eau bouillie additionnée de quelques gouttes de solution d'alizarine-sulfonate de sodium à 10 p. 100.

Cinq centimètres cubes, exactement mesurés, de culture filtrée étaient introduits dans le ballon, additionnés d'une goutte de phtaléine et de 80 centimètres cubes d'alcool redistillé à 95°. Après addition goutte à goutte de lessive de soude jusqu'à léger virage au rose, le ballon était rapidement relié, d'abord au réfrigérant, puis au tube d'arrivée de la vapeur d'eau. Après quelques instants cette vapeur se condensait dans le ballon plus froid et l'ammoniac était complètement entraîné, distillé, recueilli et titré en présence d'alizarine, à l'aide d'une solution décimormale d'acide sulfurique.

J'ai vérifié que les résultats obtenus par cette méthode, soit avec des milieux peptonés alcalinisés par l'ammoniaque, soit avec 2 centimètres cubes d'une solution contenant 5 p. 1.000 d'asparagine, 5 p. 1.000 de glycocolle et 5 p. 1.000

de sulfate d'ammonium, étaient d'une part constants, et d'autre part correspondaient bien uniquement à l'azote du sulfate d'ammonium introduit.

DOSAGE DE L'AZOTE DES ACIDES AMINÉS ET DES POLYPEPTIDES *par la méthode de R. MARTENS* [129], appliquée en 1933 par PEIRIER et NGUYEN KIM-KIN [146] au dosage rapide des acides aminés et des polypeptides dans le nuoc-mam.

Je notais d'abord la quantité de soude ou d'acide chlorhydrique, en solutions décimolales, nécessaire pour amener 5 centimètres cubes de la liqueur à étudier à une réaction neutre à l'azolithmine ($pH = 6,8$). Puis, j'introduisais successivement dans une fiole jaugée de 50-55 centimètres cubes, 50 centimètres cubes environ d'alcool à 96°, puis 5 centimètres cubes exactement mesurés de la liqueur à titrer, enfin les quelques gouttes de solution alcaline ou acide diluée nécessaires pour amener la réaction à $pH = 6,8$; j'ajustais enfin à 55 centimètres cubes exactement avec de l'alcool à 96°. J'obtenais ainsi une solution alcoolique correspondant à 80° environ que je filtrais pour obtenir une liqueur bien limpide. 25 centimètres cubes de cette solution étaient alors additionnés, et dans tous les cas, d'une même dose de thymolphtaléine (X gouttes d'une solution alcoolique à 0,25 p. 100), et je déterminais les carboxyles A des acides aminés et des polypeptides en ajoutant de la soude décimolale jusqu'à virage au bleu commençant ($pH = 9,3$).

J'ajoutais immédiatement après X gouttes d'une solution alcoolique de rouge de méthyle à 0,25 p. 100. Le mélange prend une teinte vert jaunâtre, mais vire au rouge dès que l'on ajoute quelques gouttes d'une solution décimolale d'acide chlorhydrique. Celle-ci est versée jusqu'à ce que le pH de la solution atteigne la valeur 5,5 (un témoin était constitué par un mélange tampon de phosphates, au même pH).

Le nombre de centimètres cubes d'acide chlorhydrique ajoutés me permettait de déterminer la valeur des groupements aminés B.

Enfin à 25 centimètres cubes de la solution alcoolique filtrée j'ajoutais 17 centimètres cubes d'eau bouillie. La concentration en alcool obtenue était alors de 50° environ. J'ajoutais X gouttes de phénol-phtaléine et je titrais avec de la soude décinormale jusqu'à virage au rose faible ($pH = 8,2$). (La coloration obtenue était comparée à celle d'un mélange tampon de phosphates au même pH). D'ailleurs le virage est net.

Le nombre C de centimètres cubes versés servait à calculer la valeur des acides aminés D en appliquant la formule $D = \frac{(A - C) 400}{77}$. La valeur (A — D) permet de calculer l'azote des polypeptides.

Ce dosage est très simple et peut servir à déterminer facilement les acides aminés et les polypeptides avec une approximation suffisante pour des recherches comparatives.

Comme R. MARTENS l'indique d'ailleurs, cette méthode n'est pas applicable à l'étude des milieux additionnés d'asparagine ou d'acide aspartique.

Les volumes de solutions titrées à ajouter sont relativement faibles, de 1 à 2 centimètres cubes environ ; je me suis donc servie pour ces dosages de burettes de 5 centimètres cubes, graduées en vingtièmes de centimètre cube, et qui permettent d'apprécier très facilement le quarantième de centimètre cube. Cette précision était d'ailleurs suffisante pour le but que je me proposais.

DOSAGE DE L'AZOTE CONTENU DANS LES PRÉCIPITÉS DE PHOSPHATE AMMONIACO-MAGNÉSIE. — Les milieux synthétiques additionnés d'asparagine et ensemencés avec *B. tumefaciens* H. et Ant. ont présenté, après six semaines de développement à 30°, d'abondants précipités de phosphate ammoniaco-magnésien que j'ai recueillis soigneusement par filtration et lavés avec 200 centimètres cubes d'eau distillée. Comme j'ai opéré à 20°, j'ai tenu compte dans mes calculs de la solubilité du

sel à cette température. Celle-ci est de 0 g. 052 de sel anhydre $\text{PO}^4\text{MgNH}^4, 6\text{H}_2\text{O}$ pour 100 centimètres cubes.

Après redissolution du précipité, j'ai dosé l'ammoniaque sur une partie aliquote à l'aide du réactif de NESSLER, en me servant comme témoin d'une solution à 0 g. 005 p. 1.000 de sulfate d'ammonium sec.

La comparaison des teintes obtenues au colorimètre m'a permis de doser approximativement l'azote correspondant à la totalité des précipités de phosphate ammoniaco magnésien.

C. - ACTION SUR LA PEPTONE PANCRÉATIQUE DE PANSES

RÉSULTATS QUALITATIFS OBTENUS. — Les milieuxensemencés avec *B. tumefaciens* H. et Ant. ont été conservés à 30° soit pendant un mois, soit pendant un an. Ils présentaient une réaction alcaline correspondant à $p\text{H} = 8,5$ ou 8,8 et les cultures jeunes ou très anciennes ne contenaient ni composé alcoolique, ni composé cétonique, ni acide fixe. On ne pouvait y déceler que des traces d'aldéhyde. Toutes les recherches effectuées pour essayer de caractériser la présence d'amines volatiles ou fixes, de choline, d'acides ou d'amines cycliques ou hétérocycliques, d'indol, n'ont apporté aucun résultat positif.

La teneur en acides volatils d'après les distillations de DUCLAUX est, dans tous les cas, peu importante, particulièrement après un mois de séjour à 30°. Il semble, en effet, que cette proportion soit environ trois fois plus faible que dans les mêmes cultures âgées de un an. Comme je l'avais déjà remarqué en étudiant la formation d'acides volatils dans les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur eau peptonée additionnée de glucose, après un mois à 30°, on trouve surtout de l'acide acétique, avec des proportions plus ou moins grandes d'acide valérianique (environ 1 partie d'acide valérianique pour 3 parties d'acide acétique dans le cas de la

variété H., et seulement 1 partie d'acide valérianique pour 10 parties d'acide acétique dans les cultures de la variété Ant.).

Mais, au contraire, après un an, les cultures de *B. tumefaciens* Ant. sont nettement plus riches en acide valérianique que celles de la variété H. En effet, on peut déceler alors, et plus facilement, les proportions d'acide valérianique et d'acide acétique.

B. tumefaciens H. : acide valérianique 1 + acide acétique 4.

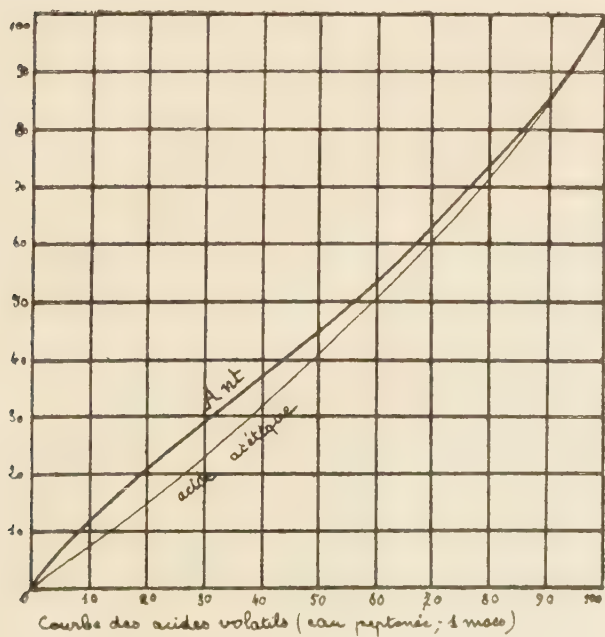
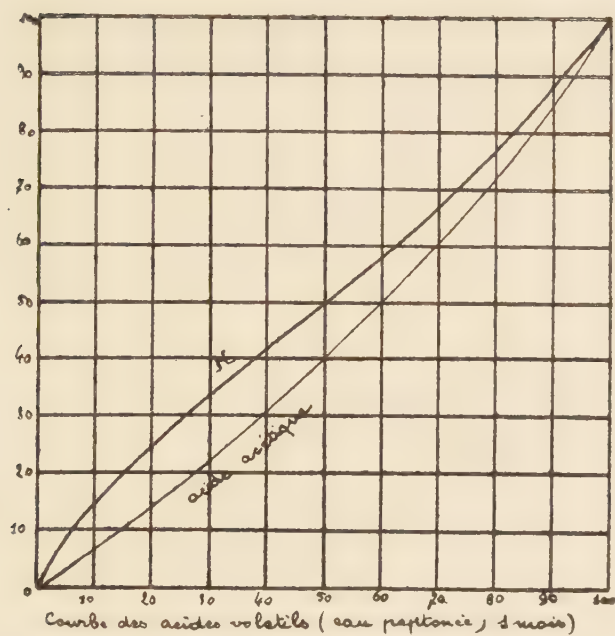
B. tumefaciens Ant. : — 4 + — 1.

RÉSULTATS QUANTITATIFS

1° Cultures de 1 mois.

	Témoin (p. 1000)	H. (p. 1000)	Ant. (p. 1000)
N total (KJELDAHL)	2,71	2,54	2,63
N ammoniacal (FOREMAN)	0,056	0,616	0,392
N (ac. aminés + NH ³) (SÖRENSEN).	0,808	1,053	1,004
N fonctions amines des ac. aminés et des polypeptides (MARTENS)	1,032	1,340	1,248
N (acides aminés) (MARTENS)	0,399	0,493	0,519
N (fonctions amines des polypeptides) (MARTENS)	0,405	0,468	0,498
COOH des ac. aminés et polypeptides (MARTENS)	2,925	3,618	3,717

Après un mois à 30°, les résultats obtenus à l'aide des dosages d'azote total indiquent que la quantité de protides attaqués par *B. tumefaciens* H. est plus grande que celle correspondant à la variété Ant. De plus cette première variété est capable, probablement à cause de son activité biochimique déjà plusieurs fois reconnue comme supérieure, de pousser plus loin la désintégration de la peptone. En effet, la proportion d'acides aminés formés est légèrement



plus faible et au contraire la quantité d'ammoniaque beaucoup plus grande dans les milieux ensemencés avec la variété H.

2° Cultures de 1 an.

	H. (p. 1000)	Ant. (p. 1000)
N total (KJELDAHL)	1,460	1,350
N ammoniacal (FOREMAN)	0,243	0,350
N (ac. aminés + NH ³) (SØRENSEN).	0,616	0,456
N (fonctions amines des ac. aminés et des polypeptides (MARTENS)	0,918	0,796
N (ac. aminés) (MARTENS)	0,280	0,157
N (fonctions amines des polypeptides) (MARTENS)	0,526	0,472
COOH (des ac. aminés et polypeptides) (MARTENS).	2,840	2,170

On peut déduire des résultats indiqués ci-dessus que la teneur en azote total des deux cultures n'est pas très différente. Mais cet azote est inégalement réparti. La proportion d'ammoniaque est, en effet, beaucoup plus grande, et celle des acides aminés beaucoup plus faible, dans les milieux ensemencés avec la variété Ant. Ceci explique pourquoi la réaction des cultures de *B. tumefaciens* Ant. est toujours légèrement plus alcaline.

Naturellement, en raison du degré de précision si différent des méthodes employées, on ne peut tenir compte, en valeur absolue, des résultats de ces dosages; mais ils sont quand même à retenir pour les comparaisons qu'ils permettent d'établir entre les deux variétés H. et Ant.

Il faut remarquer que, dans l'état actuel de nos connaissances, on ne peut pas, dans le calcul du bilan azoté des cultures microbiennes aérobies, attribuer un rôle aussi important qu'autrefois au chiffre d'azote total fourni par la méthode de KJELDAHL. En effet, tout récemment M. LEMOIGNE, F. DOPTER et R. DESVEAUX [109] ont montré que dans les cul-

tures âgées il y a souvent un déficit important de l'azote ainsi titré. Ces auteurs ont constaté qu'à partir du quinzième jour environ, ce déficit s'accroît peu à peu, et peut atteindre et même dépasser 30 p. 100 de l'azote initial. Ces pertes, d'ailleurs, sont très irrégulières [110]. Les bactéries produisant ce phénomène sont des espèces banales des eaux, des milieux naturels, et notamment du sol ; il est donc fort possible qu'il se produise dans les cultures de *B. tumefaciens*.

D. — ACTION SUR L'ACIDE ASPARTIQUE

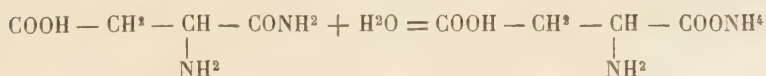
Pour cette étude, j'ai utilisé le milieu suivant :

Eau distillée	1.000 g.
PO ⁴ HK ²	1,5
PO ⁴ K ³	8
SO ⁴ Mg crist.	0,75
Solution oligodynamique .	V gouttes
Acide aspartique gauche .	5 g.

amené à pH = 6,5 avec une solution de lessive de soude diluée, reparti en fioles coniques, puis stérilisé à 115° pendant 20 minutes.

Après deux mois de séjour à 30°, de nombreux cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien s'étaient déposés dans ces cultures dont la réaction était très alcaline (pH = 8,2). Après filtration, et en employant les procédés indiqués plus haut, j'ai essayé de caractériser les produits formés. Je n'ai pu déceler la présence d'alcoylamines, d'amines, d'amino-alcools, de diamines, de composés imidazoliques.

A. BLANCHETIÈRE en 1917 [45] a montré que dans l'attaque de l'asparagine par le *B. fluorescent* liquéfiant de PFLÜGGE, deux phases peuvent être mises en évidence, à chacune desquelles correspond la mise en liberté d'un atome d'azote à l'état ammoniacal. Le premier atome d'azote séparé est l'atome amidé, l'hydrolyse s'effectuant d'après la réaction étudiée par ARNAUD et CHARRIN :



c'est-à-dire avec formation d'aspartate d'ammonium. La bactérie continuant son action, c'est l'acide aspartique de ce sel qui est attaqué avec libération d'ammoniaque et de produits variés dont la formation a été mise en évidence par de nombreux auteurs cités par A. BLANCHETIÈRE. Tous ces faits ont été indirectement confirmés par les recherches de E. AUBEL [1] sur le bacille de GESSARD.

J'ai donc recherché si *B. tumefaciens* H. et Ant., dans l'attaque de l'acide aspartique, pouvaient élaborer les composés signalés par A. BLANCHETIÈRE dans le cas du Bacille fluorescent et par E. AUBEL avec le Bacille pyocyanique. Après distillation des cultures sur acide aspartique, cultures préalablement acidifiées par de l'acide sulfurique, les premières portions recueillies dans un tube entouré d'un mélange de glace et de sel ne renfermaient pas trace d'acides volatils. Je n'ai donc pu mettre en évidence l'acide propionique, l'acide acétique ou l'acide formique. Après refroidissement le résidu de cette distillation était plus fortement acidifié par de l'acide sulfurique et épuisé à quatre reprises par son volume d'éther. Bien que j'aie opéré en tenant strictement compte des indications données par BLANCHETIÈRE, je n'ai jamais pu déceler la moindre trace d'acide fumarique dans l'extrait éthéré d'un litre de culture. Cet acide, en effet, à cause de sa très faible solubilité dans l'eau, aurait dû rester insoluble, après quelques jours de contact à la glacière, dans les quelques centimètres cubes d'eau avec lesquels l'extrait avait été repris.

Pour la recherche de l'acide malique j'ai appliqué les indications données par G. BERTRAND et par BLANCHETIÈRE. En outre, j'ai pratiqué la réaction suivante : une solution d'acide malique, traitée par un dixième de son volume d'acétate de mercure et chauffée à l'ébullition, donne un précipité blanc d'oxalacétate de mercure par addition de permanganate de potassium ajouté goutte à goutte (DENIGÈS).

L'acide malonique a été recherché par la méthode de BOUGAULT [52] également appliquée par BLANCHETIÈRE [46], c'est-à-dire en provoquant la condensation de l'acide malonique avec l'aldéhyde cinnamique de manière à obtenir la formation d'acide cinnamylidène-malonique très soluble dans l'alcool fort, et cristallisant en longues aiguilles primastiques obliques de coloration jaune.

Les liqueurs correspondant aux cultures des variétés H. et Ant. ont toujours donné des résultats négatifs pour la recherche des acides succinique, malique et malonique. *B. tumefaciens* H. et Ant., dans les conditions de culture où je me suis placée, ne dégradent donc pas l'acide aspartique, et, par suite, l'asparagine, selon le processus indiqué plus haut.

Voici, d'autre part, les résultats des dosages d'azote effectués sur les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. en milieu aspartique, après six semaines de séjour à 30°.

	Témoin (p. 1000)	H. (p. 1000)	Ant. (p. 1000)
N total (KJELDAHL)	0,574	0,276	0,346
N ammoniacal (FOREMAN)	0	0,196	0,224
N (ac. aminés + NH ²) (SÖRENSEN).	0,466	0,198	0,280

De ces résultats on peut déduire qu'après trois semaines de séjour à 30° l'acide aspartique a disparu complètement dans le cas de la variété H. et presque totalement dans les milieuxensemencés avec *B. tumefaciens* Ant. Il s'est formé une grande proportion d'ammoniaque, légèrement plus faible cependant dans les cultures correspondant à la variété H.

E. — ACTION SUR L'ASPARAGINE

J'ai utilisé la solution suivante :

Eau distillée	1.000 g.
PO ⁴ HK ²	1,5
PO ⁴ H ² K	2,5
SO ⁴ Mg crist.	0,75
Solution oligodynamique .	V gouttes
Asparagine	5 g.

dont le pH, égal à 6,5 est demeuré le même après stérilisation à 115° pendant 20 minutes dans des fioles coniques de verre Sibor.

Après deux mois à 30°, le milieu témoin était resté incolore et limpide alors que les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. étaient colorées en jaune brun et présentaient un abondant dépôt de phosphate ammoniaco-magnésien. La réaction des milieuxensemencés correspondait à pH = 8,2 alors que la solution témoin était demeurée à pH = 6,5.

Voici les résultats des dosages de l'azote sous ses différentes formes :

	Témoin (p. 1000)	H. (p. 1000)	Ant. (p. 1000)
N total (KJELDAHL).	0,980	0,483	0,512
N ammoniacal (FOREMAN)	0	0,336	0,370
N (ac. aminés + NH ³) (SÖRENSEN).	0,367	0,354	0,375
N (du phosphate ammoniaco-magnésien)	0	0,036	0,032

Puisque dans les titrages d'asparagine un seul atome est décelable par la méthode au formol, et sous réserve des phénomènes de rétrogradation si complexes rappelés par A. BLANCHETIÈRE, qui aboutiraient à la synthèse de produits n'intervenant sans doute pas dans le dosage SÖRENSEN, il semble que l'on puisse conclure que les deux variétés H. et Ant. attaquent l'asparagine avec une même énergie.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES ACTIVITÉS DIASTASIQUES DE *B. TUMEFACIENS*

Erwin F. SMITH ayant constaté que le suc des tumeurs de Betterave exposé à l'air devenait rapidement noir comme de l'encre, divers auteurs, étudiant après lui les caractères physiologiques de *B. tumefaciens*, ont recherché si cet agent pathogène pouvait former des oxydases *in situ* et les laisser diffuser dans le tissu néoplasique. En 1927, ISRAILKY [94] indiquait la présence d'oxydases, de catalase et d'un ferment protéolytique dans des tumeurs qui s'étaient développées sur des Raves.

Toutefois, si ces recherches pouvaient présenter un certain intérêt pour les phytopathologistes, il importait également de rechercher, dans les cultures ou les extraits de *B. tumefaciens*, les plus importantes des diastases qui pouvaient s'y trouver.

Dans ce but, j'ai examiné, d'une part des cultures en milieu liquide synthétique, soit filtrées, soit totales, mais tuées par le chloroforme, d'autre part des extraits bactériens. Pour obtenir ceux-ci je me servais de corps microbiens récoltés par la technique de M. NICOLLE et ALLILAIRE et je préparais des extraits glycérolés (1 partie de corps microbiens + 2 ou 3 parties de glycérol), des extraits autolytiques aqueux chloroformés, et des poudres de bacilles traités par l'acétone. J'ai préparé également des extraits au saccharose (stérilisés par l'éther) selon la technique de A. BERTHELOT [59], utilisée

par cet auteur pour extraire divers enzymes de certaines bactéries de la flore intestinale.

Soit pour les cultures autolysées, soit dans le cas d'extraits microbiens employés à des dilutions variées, j'ai pratiqué tous mes essais en suivant scrupuleusement les indications données par G. BERTRAND [41], H. COLIN [64] ou H. W. ONSLow [139]; de plus, je me suis placée, pour chaque cas particulier, dans les conditions de pH , de température et de temps qui correspondaient à l'optimum de l'activité diastasique; enfin, j'ai toujours contrôlé ma technique et mes réactifs en opérant des réactions-témoins sur des liqueurs contenant une proportion suffisante de l'enzyme recherché.

Mais, malgré les précautions prises, je n'ai pu déceler la présence dans les solutions étudiées d'aucune des diastases suivantes : sucrase, lactase, dextrinase, amylase, protéidase, présure, laccase, tyrosinase, peroxydiastases ou uréase. Par contre, les extraits glycérolés ou autolytiques des corps microbiens des deux variétés H. et Ant. m'ont permis de caractériser la présence d'une catalase déjà trouvée par ISRAÏLKY dans les tumeurs des plantes.

Or, les déterminations biochimiques que j'ai rapportées dans le présent travail ont montré que si *B. tumefaciens* est sans action sur la gélatine et l'ovalbumine, et s'il ne détermine pas la coagulation du lait, il attaque nettement le saccharose, l'amidon et plus faiblement l'urée.

Les résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus dans l'étude des milieux additionnés de saccharose montrent l'existence évidente d'une sucrase. Il semble qu'on puisse également affirmer, d'une part la présence d'une dextrinase et d'une amylase, d'autre part celle d'une uréase. Il y aurait donc lieu de conclure que chez *B. tumefaciens* ces quatre diastases sont nettement endocellulaires, qu'elles sont étroitement liées à la vie et à la substance du cytoplasme, et qu'elles ne diffusent pas dans le milieu extérieur, au moins dans les conditions d'expérience où je me suis placée.

Quant aux autres enzymes que plusieurs expérimentateurs n'ont pu déceler dans les tumeurs causées par *B. tumefaciens* et que j'ai également recherchés en vain dans les cultures, les produits d'autolyse et les extraits de la bactérie pathogène, il est possible que certains d'entre eux ne soient pas élaborés par ce microbe ; d'autres le sont peut-être, mais restent toujours intracellulaires, cytoplasmiques, et font en quelque sorte partie intégrante de la matière vivante. Par des artifices mécaniques, ou en faisant varier considérablement les conditions physico-chimiques de l'autolyse des corps microbiens, peut-être arriverait-on à mettre en évidence quelqu'une de ces diastases ; mais l'examen de ce seul point de la biochimie et de la physiologie de *B. tumefaciens* aurait demandé de très longues recherches qu'il ne m'a pas été possible d'entreprendre.

Toutefois, au point de vue pathogénique, l'étude de l'action de *B. tumefaciens* sur les substances pectiques peut présenter quelque intérêt. Il m'a donc semblé utile de signaler dans ce chapitre les quelques essais que j'ai entrepris.

Depuis les importantes recherches au cours desquelles G. BERTRAND et MALLEVRE [38] ont étudié le mécanisme diastatique de la gélatinisation des solutions de pectine, de nombreux travaux ont été effectués pour essayer d'établir la constitution des divers composés appartenant à ce groupe (travaux de SCHRYVER et HAYNES — F. EHRLICH-FELLENBERG et NANJI — PATON et LING-NORRIS — SCHRYVER-NORRIS et NORMAN — ceux de l'Abbé COLIN). On sait donc que les pectines sont des composés très complexes, renfermant des glucides réducteurs (galactose, arabinose), des groupements acétylés et oxyméthylés, des acides uroniques, eux-mêmes engagés dans un complexe très résistant à l'hydrolyse. D'après l'Abbé COLIN [66] on devrait considérer désormais « que la pectine proprement dite est un complexe d'arabane et de pectate calco-magnésien. Les solutions de pectines ou hydratopectines ne

seraient qu'un mélange de ces deux constituants l'un et l'autre solubles ».

Cette complexité même de leur composition chimique et surtout la grande facilité avec laquelle les pectines libèrent des sucres réducteurs, rendent délicate la recherche d'un enzyme susceptible de déterminer l'hydrolyse plus ou moins profonde de ces substances. Par contre, il est plus aisé de rechercher l'existence d'une diastase capable de déterminer la prise en gelée de solution de pectine. J'ai donc essayé de déterminer la gélification à 30° d'une solution à 3 p. 100 de pectine sèche de Citron additionnée de 0,15 p. 100 de Cl^2Ca . J'étudiais parallèlement, et l'action des solutions aqueuses de mes extraits microbiens, et celle d'une solution de pectase de Carotte préparée suivant G. BERTRAND et MALLEVRE [38]. Alors que, dans les mêmes conditions, la gélification de la pectine nécessitait, avec cette pectase, un temps variant entre 3 et 8 heures, mes solutions d'origine bactérienne n'ont jamais provoqué la gélification, même en 48 heures, et malgré la précaution que j'avais prise de ramener les liqueurs à $\text{pH} = 6$.

Les deux variétés H. et Ant. de *B. tumefaciens* ne semblent donc pas élaborer de pectase; mais il est possible que l'enzyme recherché existe dans la bactérie vivante et manifeste son action dans les tissus de la plante parasitée.

En ce qui concerne la production d'une diastase capable d'hydrolyser les composés pectiques, diastase que BOURQUELOT et HERISSEY [53] ont appelée pectinase à une époque où l'on connaissait moins bien la constitution des composés pectiques et la nature des phénomènes où ces substances complexes entrent en jeu, j'ai abordé d'une manière indirecte la recherche de cet enzyme et j'ai opéré de la façon suivante :

De petits fragments de racine de Betterave, de tige, de pétiole ou de feuille d'Anthémis, après avoir été stérilisés dans un milieu synthétique convenable (voir p. 28), ont subi

pendant trois semaines l'action des produits élaborés par *B. tumefaciens* H. et Ant., ou diffusés dans les milieux par l'autolyse des corps microbiens. Malgré le développement exubérant des cultures et le temps d'action très prolongé, aucune apparence de désagrégation ou de modification des tissus végétaux n'était visible à l'œil nu. La comparaison était effectuée avec des fragments identiques, stérilisés dans le même milieu et gardés simplement à 30°.

Je ne me suis pas contentée de cet examen macroscopique. J'ai durci, par séjour dans l'alcool à 60°, quelques témoins et les fragments soumis à l'action de *B. tumefaciens*; de fines coupes effectuées à main levée ont été traitées d'abord par l'hypochlorite de sodium, puis par l'eau acétique. Les coupes, ainsi pratiquement débarrassées du contenu cellulaire, ont été rincées dans de l'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'ammoniaque et je les ai colorées par une solution aqueuse faible d'oxychlorure de ruthénium (sel de JOLY) dont l'affinité pour les matières pectiques qui constituent le ciment intercellulaire est bien connu. Ces coupes, traitées par la glycérine diluée, ont été montées entre lame et lamelle dans de la gélatine glycéринée phéniquée. Malgré l'examen microscopique le plus attentif de l'aspect des cadres cellulaires et du contenu pectique des espaces existant entre les cellules, je n'ai pu déceler de différence entre les tissus témoins et les tissus traités par *B. tumefaciens* H. et Ant., même dans les parties correspondant aux couches les plus superficielles des fragments végétaux.

Comme dans ces essais j'avais opéré avec des parcelles de plantes ayant subi l'action de la chaleur, j'ai tenté également un essai en opérant sur les tissus frais de la Betterave blanche fourragère. Pour cela j'ai stérilisé à l'hypochlorite de calcium la surface de quelques betteraves bien lavées et de forme régulière; puis, après rinçage à l'eau légèrement acétique, immersion dans l'alcool et séchage sur papier stérile, j'ai coupé des tranches épaisses de racine, en opérant

aussi aseptiquement que possible avec un couteau stérile. J'ai placé ces rondelles dans des boîtes de PETRI stériles, puis j'ai déposé au centre de leur surface X à XX gouttes des extraits que je désirais étudier. Les boîtes étant recouvertes, je les ai abandonnées huit jours à la température du laboratoire (12 à 20°). Les échantillons où s'étaient développées quelques moisissures hors de la zone inoculée étaient tout d'abord éliminés. Puis, les tranches traitées par *B. tumefaciens* H. et Ant. étaient comparées aux fragments-témoins obtenus dans les mêmes conditions, soit par examen à la loupe, soit tels quels au microscope, soit enfin à l'aide de coupes soumises au colorant spécifique. Pas plus que dans l'expérience précédente, je n'ai pu mettre en évidence la disparition ou la désagrégation des ciments pectiques intercellulaires.

Contrairement à ce qui se passe avec d'autres bactéries pathogènes pour les végétaux supérieurs, *B. tumefaciens* ne semble donc pas produire de « pectinase » dans les conditions de mes expériences, ou, du moins, s'il en élabore ce serait une pectinase endocellulaire, difficile à séparer du cytoplasme ou se détruisant à mesure de sa diffusion dans le milieu extérieur. *A priori*, il y avait d'ailleurs peu de chances de rencontrer un enzyme pectinolytique chez *B. tumefaciens*. Ce microbe, en effet, excite surtout la prolifération cellulaire et reste cantonné dans les couches superficielles des tumeurs dont il provoque l'apparition. D'autres bactéries pathogènes, au contraire, désagrègent énergiquement les ciments intercellulaires et envahissent rapidement, et de proche en proche, les tissus de la plante parasitée.

Quoiqu'il en soit ce problème de l'hydrolyse diastasique des pectines est très complexe, et j'ai dû borner, pour le moment, aux expériences ci-dessus mes recherches comparatives sur les propriétés diastasiques de *B. tumefaciens* H. et Ant.

CONCLUSIONS

J'ai essayé dans ce travail de comparer entre elles deux variétés de *Bacterium tumefaciens* douées d'un pouvoir pathogène relativement spécifique; l'une déterminait des tumeurs sur le Houblon, l'autre sur l'Anthémis, et toutes deux se montraient pathogènes, pour *Pelargonium zonale*.

I. — L'examen de ces deux variétés par des méthodes bactériologiques m'a permis de vérifier que :

1° Ces microbes sont essentiellement aérobies ; cependant l'un d'eux (Ant.) a une tendance plus marquée à donner des voiles en milieux liquides, tandis que la variété II. trouble ceux-ci uniformément.

2° *B. tumefaciens* Ant. est seul capable de se développer sur une décoction de Betterave rouge. Les deux variétés n'ont donné aucune culture par ensemencement sur des macérations de géranium.

3° Les milieux d'origine végétale, et notamment ceux à base de peptone pepsique de tourteaux d'Arachide, se sont montrés particulièrement favorables au développement des deux variétés.

4° Celles-ci attaquent énergiquement les sucres et, soit en milieu synthétique, soit même en milieu peptoné, c'est avec l'arabinose et le xylose que l'acidification est la plus accentuée.

5° J'ai vérifié que ces deux microbes ne liquéfient pas la gélatine, qu'ils ne provoquent pas la coagulation du lait, et ne donnent pas d'indol.

6° Les acides aspartique et glutamique d'une part, l'asparagine d'autre part, sont, parmi les acides aminés ou les amides, ceux qui peuvent constituer une source d'azote particulièrement bien utilisée par *B. tumefaciens* H. et Ant.

II. — En ce qui concerne les propriétés biochimiques, les différences qui existent entre *B. tumefaciens* H. et Ant. sont presque exclusivement d'ordre quantitatif.

En effet, l'étude comparative de l'action des deux souches sur les composés ternaires ou azotés montre que les produits formés dans les cultures sont pratiquement les mêmes.

1° Dans les conditions de culture où je me suis placée *B. tumefaciens* H. et Ant. ne produisent que de faibles traces d'aldéhydes, ne donnent pas d'acides fixes et ne fournissent des acides volatils (ac. acétique et ac. valérianique) qu'en proportions minimales.

Ces deux bactéries attaquent facilement le glucose, le fructose et l'arabinose sans que j'aie pu déceler quelque produit intermédiaire provenant de l'oxydation de ces glucides. Dans des cas bien déterminés elles sont capables de former de l'acétylméthylcarbinol.

2° L'étude de l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les composés azotés a montré que ces deux variétés étaient toutes deux ammonifiantes et qu'elles pouvaient détruire complètement certains acides aminés introduits dans les cultures, tout particulièrement les acides glutamique et aspartique, et l'asparagine.

III. — L'importance que je tiens à donner aux ressemblances qui existent entre les deux variétés H. et Ant. ne doit pas m'empêcher de noter que ces deux souches présen-

tent pourtant des caractères particuliers qui se retrouvent toujours les mêmes dans toutes les conditions de milieu.

En effet, *B. tumefaciens* H. semble capable d'attaquer plus vite et plus profondément les composés carbonés et azotés qui lui sont offerts. Les dosages effectués indiquent, pour cette variété, une quantité plus grande de substances détruites et d'acides libres présents dans les cultures.

Au contraire, la proportion d'azote ammoniacal est nettement supérieure dans les milieux ensemencés avec la variété Ant.

La quantité des acides volatils qui peuvent se former dans les deux cas est très minime. Cependant la proportion d'acide valérianique est nettement supérieure dans les cultures de *B. tumefaciens* Ant., particulièrement dans les cultures âgées.

IV. — L'étude sommaire des diastases des deux variétés H. et Ant. a permis d'établir la présence d'une catalase que des auteurs avaient déjà trouvée dans les tumeurs des plantes infectées avec *B. tumefaciens*. Aucun autre enzyme n'a pu être décelé à l'aide des techniques employées.

V. — Si l'on s'en rapporte aux règles de la systématique bactérienne telles que A. R. PRÉVOT les a récemment indiquées, il paraît évident qu'il ne s'agit bien là que de variétés, de races, de l'espèce *B. tumefaciens* « SMITH et TOWNSEND ». Quelle autre conclusion pourrait venir à l'esprit dans l'état actuel de nos connaissances sur « la plasticité » morphologique ou physiologique des bactéries et sur la grande variabilité de leurs caractères biologiques ou biochimiques ? Ceux-ci ne se modifient-ils pas profondément, en effet, sous l'influence de minimes modifications dans la composition ou dans les propriétés physico-chimiques du liquide nutritif ?

Certes, il eut été intéressant d'essayer par des passages répétés en milieux, ou synthétiques, ou d'origine naturelle, de

faire varier, peut-être même qualitativement, certaines de leurs activités biochimiques et d'examiner parallèlement les variations éventuelles de leur spécificité pathogénique. Mais, en raison de la lenteur des expériences phytopathologiques, il m'a été impossible d'aborder de telles recherches.

BIBLIOGRAPHIE

1. AUBEL (E.). — Recherches biochimiques sur la nutrition du Bacille pyocyanique. *Th. Doct. ès Sc.*, 1921.
2. BAGROS (M.). — Le mécanisme de la dénitrification par les bactéries dénitrifiantes indirectes. *Th. Doct. Univ. Pharm.*, 1910.
3. BECHHOLD (H.) et SMITH (L.). — Das Tumefaciens-plastin. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1927, **25**, 97-104.
4. BERGEY. — Manual of Determinative Bacteriology. William and Wilkins, Baltimore, 1923, 189-190.
5. BERNIER (R.). — Sur la présence de l'acide glycuronique et de certains hydrates de carbone dans l'urine normale. *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1910.
6. BERTHELOT (A.). — Étude biochimique de deux microbes anaérobies du contenu intestinal. *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, **23**, 86.
7. BERTHELOT (A.). — Recherches sur la flore intestinale. Isolement des microbes qui attaquent spécialement les produits ultimes de la digestion des protéiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1911, **153**, 306.
8. BERTHELOT (A.). — Sur l'emploi des milieux définis à base de tryptophane. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **72**, 595.
9. BERTHELOT (A.). — Recherches sur quelques caractères du *Proteus vulgaris*. *Th. Doct. Méd.*, Paris, 1913.
Recherches sur le *Proteus vulgaris*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1914, **28**, 839.
10. BERTHELOT (A.). — Recherches sur la production du phénol par les microbes. *C. R. Ac. Sc.*, 1917, **164**, 196.
11. BERTHELOT (A.). — Sur l'emploi du bouillon de légumes comme milieu de culture. *C. R. Soc. Biol.*, 1917, **80**, 131.
12. BERTHELOT (A.). — Recherches sur la flore intestinale. Contribution à l'étude des microbes producteurs du phénol. Principaux caractères du *Bacillus phenologenes*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1918, **32**, 17.
13. BERTHELOT (A.). — a) Recherches sur l'acide pyruvique considéré comme facteur d'anaérobiose. *C. R. Ac. Sc.*, 1923, **176**, 1929.
b) Recherches biochimiques sur l'acide pyruvique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, 326.

14. BERTHELOT (A.). — Remarques sur l'emploi des milieux synthétiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1926, **40**, 440.
15. BERTHELOT (A.). — Sur un milieu de culture artificiel convenant particulièrement au *B. tumefaciens*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 109.
16. BERTHELOT (A.). — Milieux chimiquement définis et milieux naturels. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 1025.
17. BERTHELOT (A.). — Sur les régulateurs de la réaction des cultures microbiennes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 280.
18. BERTHELOT (A.). — Nouvelles remarques d'ordre chimique sur le choix des milieux de culture naturels et sur la manière de formuler les milieux synthétiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934. Séance du 3 juillet.
19. BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (M^{lle} G.). — Sur la présence d'acide pyruvique dans le contenu intestinal. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, 338.
20. BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (M^{lle} G.). — Influence du pyruvate de sodium sur les bactéries phosphorescentes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, 336.
21. BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (M^{lle} G.). — Sur l'auto-élimination de l'ammoniaque dans les cultures microbiennes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 932.
22. BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (M^{lle} G.). — Remarques sur l'emploi des sels d'acides gras comme régulateurs de la réaction des cultures microbiennes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 286.
23. BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (M^{lle} G.). — Sur quelques milieux synthétiques propres à l'étude de *B. tumefaciens*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934. Séance du 3 juillet.
24. (a) BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (M^{lle} G.). — Sur la préparation des milieux de culture à base de peptone pepsique de tourteaux d'arachide. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934. Séance du 3 juillet.
24. (b) BERTHELOT (A.), AMOUREUX (M^{lle} G.) et PETIT (D.). — Remarques sur la composition des peptones de tourteaux d'arachide et sur leur application à la culture des microbes pathogènes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 1029.
25. BERTHELOT (A.), AMOUREUX (M^{lle} G.) et VAN DEINSE (F.). — Sur les avantages de la peptone pepsique de tourteaux de Soya pour la préparation des milieux de culture. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934. Séance du 3 juillet.
26. BERTHELOT (A.) et BERTRAND (D. M.). — Recherches sur la flore intestinale. Isolement d'un microbe capable de produire de l'imidazoléthylamine aux dépens de l'histidine. *C. R. Ac. Sc.*, 1912, **154**, 1643.

27. BERTHELOT (A.) et CHADUC (M^{lle} M.). — Remarques sur l'emploi du carbonate de calcium en microbiologie. *Revue d'Hygiène*, 1927, n° 1, janvier.
28. BERTHELOT (A.), PRÉVOT (A. R.) et KARL (G.). — Les amines biologiques de M. Guggenheim (édition française). Ed. Baillière, 1934 (Voir Guggenheim).
29. BERTHELOT (A.), RAMON (G.) et AMOUREUX (M^{lle} G.). — Recherches biochimiques sur les toxines et leurs dérivés. I. Étude des facteurs qui influencent l'élaboration de la toxine tétanique et sa transformation spontanée en anatoxine. *Ann. Inst. Pasteur*, 1927, **41**, 83.
30. BERTHELOT (A.), VAN DEINSE (F.) et AMOUREUX (M^{lle} G.). — Sur l'emploi des régulateurs actifs du pH dans la culture du bacille tuberculeux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 290.
31. BERTHELOT (A.), VAN DEINSE (F.) et AMOUREUX (M^{lle} G.). — Sur l'emploi des Crosnes dans la préparation des milieux de culture. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934. Séance du 3 juillet.
32. BERTRAND (G.). — Sur la séparation de la laccase et de la tyrosinase contenues dans le suc de certains champignons. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1896 (3), **15**, 1218.
33. BERTRAND (G.). — Action de la bactérie du sorbose sur les alcools plurivalents. *C. R. Ac. Sc.*, 1898, **126**, 762.
34. BERTRAND (G.). — Action de la bactérie du sorbose sur les sucres aldéhydiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1898, **127**, 728 ; *Bull. Soc. Chim.*, 1898 (3), **19**, 199.
35. BERTRAND (G.). — Étude biochimique de la bactérie du sorbose. *Ann. Chim. et Phys.*, 1904 (8), **3**, 181.
36. BERTRAND (G.). — Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. Pharmacol.*, n° 1, janvier 1907.
37. BERTRAND (G.) et DUCHACEK (F.). — Action du ferment bulgare sur les principaux sucres. *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, **23**, 402.
38. BERTRAND (G.) et MALLÈVRE (A.). — Sur la pectase et sur la fermentation pectique. *C. R. Ac. Sc.*, 1894, **119**, 1012 et 1014.
39. BERTRAND (G.) et MALLÈVRE (A.). — Nouvelles recherches sur la pectase et la fermentation pectique. *C. R. Ac. Sc.*, 1895, **120**, 110.
40. BERTRAND (G.) et MALLÈVRE (A.). — Sur la diffusion de la pectase dans le règne végétal et sur la préparation de cette diastase. *C. R. Ac. Sc.*, 1895, **121**, 726.
41. BERTRAND (G.) et THOMAS (P.). — Guide pour les manipulations de chimie biologique, 2^e éd., Dunod et Pinat, Paris, 1913.
42. BERTRAND (G.) et VEILLON (R.). — Action du ferment bulgare sur les acides monobasiques dérivés des sucres réducteurs. *C. R. Ac. Sc.*, 1911, **152**, 330.

43. BERTRAND (G.) et WEISWEILLER (G.). — Action du ferment bulgare sur le lait. *Ann. Inst. Pasteur*, 1906, **20**, 177.
44. BLANCHETIÈRE (A.). — Contribution à l'étude biologique de quelques variétés du genre *Sporotrichum* pathogènes pour l'homme. *Th. Doct. Méd.*, Paris, 1909.
45. BLANCHETIÈRE (A.). — Action du bacille fluorescent liquéfiant de Flügge sur l'asparagine en milieu chimiquement défini. 1^{er} Mémoire : Vitesse et limite de l'attaque. *Ann. Inst. Pasteur*, 1917, **31**, 291.
46. BLANCHETIÈRE (A.). — Action du bacille fluorescent de Flügge sur l'asparagine en milieu chimiquement défini. 2^e Mémoire : Produits et mode d'attaque de l'asparagine. *Ann. Inst. Pasteur*, 1920, **34**, 392.
47. BLANCHETIÈRE (A.). — Action du bacille fluorescent liquéfiant de Flügge sur certains amino-acides en milieu chimiquement défini. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1920, **2**, 29.
48. BLUMENTHAL (F.) et AULER (H.). — Entstehung einer bösartigen Plattenepithelgeschwulst nach Impfung mit bakterienstamm. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1925, **22**, 297.
49. BLUMENTHAL (F.), AULER (H.) et MEYER (P.). — Über das Vorkommen neoplastischer Bakterien in menschlichen Krebsgeschwülsten. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1924, **21**, 387.
50. BLUMENTHAL (F.) et HIRSCHFELD (H.). — Untersuchungen über bösartige Geschwülste bei Pflanzen und ihre Erreger. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1917, **16**, 51.
51. BORCHI (B.) et LUZZATTO (G.). — Ricerche intorno al potere oncogeno del *B. tumefaciens* e del *B. Paolo Meyer* nelle piante e negli animali. *Istit. di Pat. Gen., Univ. ed Istit. Botan., R. Istit. sup. Agrario-Milano, Boll. Ist. sicroter.-milan*, 1929, **8**, 243-255.
52. BOUGAULT (J.). — Recherche et caractérisation de l'action malonique. *Journ. Pharm. Chim.*, 1913, **8**, 280.
53. BOURQUELOT (E.) et HÉRISSEY (H.). — Sur l'existence dans l'orge germée d'un ferment soluble agissant sur la pectine. *C. R. Ac. Sc.*, 1898, **127**, 191, 194.
54. BOUTROUX. — Sur une fermentation acide du glucose. *C. R. Ac. Sc.*, 1886, **102**, 924-927.
55. BROOKES (R. J. S.), NAIN et RHODES. — The investigation of phytopathogenic bacteria by serological and biochemical methods. *Journ. Path. and Bakt.*, 1925, **28**, 203.
56. BROWN (N. A.). — The tendency of the crown gall organism to produce roots in conjunction with tumors. *Journ. of Agr. Res.*, 1929, **39**, 747-766.
57. BUCHANAN (R. E.). — General systematic bacteriology. History, nomenclature, groups of bacteria (Monogr. on systematic bac-

- teriology), vol. I. William and Wilkins C°, Baltimore, 1925.
58. BURGWITZ (G.). — Untersuchungen über *Bact. tumefaciens*. Erreger des sogenannten « Pflanzenkrebses »). *Journ. de Microbiol.*, 1929, **9**, 169.
59. CALMETTE (A.), BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). — Manuel technique de microbiologie et sérologie, 3^e édit., pp. 84, 152, 170. Masson, Paris, 1933.
60. CAVARA (F.). — Aperçu sommaire de quelques maladies de la vigne parues en Italie en 1894. *Rev. Int. Vit. et d'Oenolog.*, 1894, **1**, 447, 449.
61. CAVARA (F.). — Intorno alla eziologia di alcune malattie di piante coltivate. *Staz. Sperim. Agrar. Ital. Med.*, 1897, **30**, 483.
62. CLARK (W. M.). — The determination of Hydrogen ions. Williams and Wilkins C°, Baltimore, 1920.
63. COLE (S. W.). — Practical physiological chemistry. 9^e édit., Heffer, Cambridge, 1932.
64. COLIN (Abbé H.). — Les diastases. Tome I : Les hydrolases. Doin, Paris, 1931.
65. COLIN (Abbé H.). — Hydrolyse diastasique de la pectine de betterave. IV^e Congrès de Chimie biologique, Paris, 9 novembre 1933.
66. COLIN (Abbé H.). — Les matières pectiques dans la betterave et dans les jus sucrés. IV^e Congr. intern. technique et chimique des industries agricoles, Paris, 1934.
67. CRAMER (M.). — Les sucres et leurs dérivés. Encyclopédie Scient., Doin, Paris, 1927.
68. DAUVERGNE (J.) et WEIL (L.). — Le cancer expérimental du *Sedum spectabile*. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **97**, 815.
69. DENIGES (G.), CHELLE (L.) et LABAT (A.). — Précis de chimie analytique. 6^e édit., Maloine, Paris, 1929.
70. DUCLAUX (E.). — Sur le dosage des alcools et des acides volatils. *Ann. Inst. Pasteur*, 1895, **9**, 265.
71. EFFRONT (J.). — Les enzymes et leurs applications. Gauthier-Villars, Paris, 1903.
72. EFFRONT (J.). — Les catalyseurs biochimiques dans la vie et dans l'industrie. Dunod et Pinat, Paris, 1914.
73. ELLIOT (Ch.). — Manual of Bacterial plant pathogens. Baillière, Tindall and Cox, 1930.
74. FEIGIN (B.), EPSTEIN (T.) et FUNK (C.). — Sur une tumeur végétale provoquée par une bactérie isolée d'un carcinome humain. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 1097.
75. FEIGIN (B.), EPSTEIN (T.) et FUNK (C.). — Sur trois souches de bactéries isolées des tumeurs malignes. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 199.

76. FERNBACH (A.) et SCHOEN (M.). — L'acide pyruvique produit de la vie de la levure. *C. R. Ac. Sc.*, 1913, **157**, 1478.
77. FERNBACH (A.) et SCHOEN (M.). — Nouvelles observations sur la production de l'acide pyruvique par la levure. *C. R. Ac. Sc.*, 1914, **158**, 1719.
78. FERNBACH (A.) et SCHOEN (M.). — Nouvelles observations sur la production biochimique de l'acide pyruvique. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, **170**, 764.
79. FERRARIS (F.). — Trattato di Patologia e Terapia vegetale. 3^e édit., Ulrico Hoepli Milano, 1926.
80. FOEX (E.). — Tumeurs végétales, cancer des plantes. *Revue path. comparée*, 1923, p. 28.
81. FOREMAN (W.). — Rapid volumetric methods for the estimation of aminoacids, organic acids, and organic bases. *Biochem. Journ.*, 1920, **14**, 451-473.
82. FOSSE (R.). — L'Urée. Presses Universitaires de France, Paris, 1928.
83. FRIEDEMANN (U.). — Weitere Mitteilungen über das *Bacterium tumefaciens*. *Ztschr. f. Hyg.*, 1917, **84**, 249.
84. FRIEDEMANN, BENDIX, HASSEL, MAGNUS. — Der Pflanzenkrebserreger (*B. tumefaciens*) als Erreger menschlichen krankheiten. I. *B. tumefaciens* als Erreger in einem Fall von Omarthritis purulenta duplex und einem Fall von Meningitis purulenta. *Ztschr. f. Hyg.*, 1915, **80**, 114.
85. FROIDEVAUX (J.). — Contribution à la recherche de méthodes concernant l'appréciation des phénomènes d'altération, d'autolyse et d'hydrolyse artificielle des produits naturels. *Ann. des Fals.*, 1925, n° 195, p. 19.
86. GRIMBERT (L.). — Fermentation anaérobie produite par le *Bacillus orthobutylicus*; ses variations sous certaines influences biologiques. *Th. Doct. ès Sc.*, Paris, 1893.
87. GRIMBERT (L.). — De l'unification des méthodes de culture en bactériologie. *Arch. d. Parasit.*, 1898, **1**, 191.
88. GRIMBERT (L.). — Diagnostic des bactéries par leurs fonctions biochimiques. *Ed. Rudeval*, 1903.
89. GUGGENHEIM (M.). — Les amines biologiques. Édition française par BERTHELOT (A.), PRÉVOT (A. R.) et KARL (G.). Baillière, Paris, 1934.
90. HAWK (B. P.) et BERGEIM (O.). — Practical physiological Chemistry, 10^e édit. Philadelphia, P. Blakiston's Son and C^o, 1926.
91. HENRY (T. A.). — The plant alkaloids. Second edition. J. et A. Churchill, London, 1924.
92. HERRICK (T. H.) et MAY (O. E.). — The production of gluconic acid by the *Penicillium luteum purpurogenum* group I. Some

- optimal conditions for acid formation. *Journ. of Biol. Chem.*, 1928, **77**, 185.
93. ISRAILKY (W. P.). — Bakteriophagie und pflanzenkrebs I. *Centr. f. Bakt.*, 1926 (II), **67**, 236, 242.
94. ISRAILKY (W. P.). — Bakteriophagie und pflanzenkrebs. II. *Centr. f. Bakt.*, 1927 (II), **71**, 302.
95. ISRAILKY (W. P.). — Vergleichende Untersuchungen über die Rasseneigentümlichkeiten des *B. tumefaciens* und verwandter mikroorganismen. *Centr. f. Bakt.* II, 1929, **79**, 354.
96. JENSEN (C. O.). — Undersøgelser vedrørende nogle svulstlignende dannelser hos planter. Kgl. Veterinaer-og Landbol. *Aaarskrift Serumlaboratorium*, 1918, **54**, 91-143.
97. KALANTARIAN. — Über die Ursache des Krebses oder der Kropfbildung bei der Mandel. *Veröf. d. Land. Centr. in Tiflis*, 1915 (russe).
98. KAUFFMANN (F.). — Zur Tumefaciensfrage. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1928, **28**, 109.
99. KAUFFMANN. — Weitere Erfahrungen mit *Tumefaciens* stämmen. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1927, **26**, 18.
100. KAUFFMANN (F.). — Über die veränderlichkeit von *tumefaciens bacillen*. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1928, **26**, 330.
101. KAUFFMANN (F.). — Zur Biologie der *Tumefaciens* stämme. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1930, **30**, 290.
102. KAYSER (E.). — Contribution à l'étude de la fermentation lactique. *Th. Doct. ès Sc.*, Paris, 1894.
103. KAYSER (E.). — Microbiologie Agricole, 5^e édition. Baillière, Paris, 1930.
104. KELLERMANN (K. F.). — The use of congo red in culture media. U. S. Dept. Agr. Bur. Plant. Indus. Cox, 1913, **130**, 15.
105. KORINCK (J.). — Sur la variabilité sérologique du *B. pneumoniæ* Friedländer. Publications de la Faculté des Sciences de l'Université Charles, Prague, 1925.
106. LEMOIGNE (M.). — Contribution à l'étude du rôle des microbes du groupe du *B. subtilis* dans l'épuration des eaux d'égouts, leur action sur les matières azotées et hydrocarbonées. *Th. Doct. ès Sc.*, Paris, 1913.
107. LEMOIGNE (M.). — Réaction spécifique du 2-3 butylèneglycol et de l'acétylméthylcarbinol produits dans la fermentation butylène-glycolique. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, **170**, 131.
108. LEMOIGNE (M.). — Minéralisation des composés azotés dans le sol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 1113.
109. LEMOIGNE (M.), DOPTER (P.) et DESVEAUX (R.). — Sur le bilan de l'azote titrable à la méthode de Kjeldahl dans les cultures microbiennes aérobies. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, **16**, 18.
110. LEMOIGNE (M.) et DESVEAUX (R.). — Sur le bilan de l'azote titra-

- ble par la méthode de Kjeldahl dans les cultures microbiennes aérobies. 2^e Mémoire. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934.
111. LÉVINE (M.). — Studies on plant cancers. The effects of inoculating various quantities of different dilutions of *Bacterium tumefaciens* into the Tobacco plant. *Bull. of Torrey botan.*, 1923, **50**, 231.
112. LÉVINE (M.). — Morphological changes in *Bacterium tumefaciens*. *Science*, 1925, **62**, 424.
113. LÉVINE (L.) et LÉVINE (M.). — Malignancy of the crown-gall and its analogy to animal cancer. *Journ. of Cancer Res.*, 1920, **5**, 243.
114. LIESKE (R.). — Untersuchungen über die Krebskrankheit bei Pflanzen, tiercin und Menschen. *Centr. f. Bakt.*, 1908, **108**, 118-146.
115. LINK (G.) et HULL. — Smoothness and roughness and spontaneous agglutination of *Bacterium citri*, *Bact. medicagnus* var. *phaseolica*, *Bact. phaseoli sojense* and *Bact. tumefaciens*. *Bot. Gaz.*, 1927, **73**, 412.
116. MAGROU (J.). — Tumeurs expérimentales dues au *Bacterium tumefaciens*. *Rev. Path. végét. et Entom. agric.*, 1924, **11**, 73.
117. MAGROU (J.). — Recherches expérimentales sur le cancer des plantes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1924, **38**, 851.
118. MAGROU (J.). — Recherches expérimentales sur le cancer des plantes. *Rev. Path. Comp.*, 1924, **24**, 280.
119. MAGROU (J.). — Le *Bacterium tumefaciens* dans les tissus du cancer des plantes. *C. R. Ac. Sc.*, 1926, **183**, 804.
120. MAGROU (J.). — Le cancer des plantes. Lutte contre le cancer. Paris, 1926, p. 321.
121. MAGROU (J.). — Les tumeurs des plantes. Travaux de la Clinique Chirurgicale de la Salpêtrière, publiés par A. GOSSET, 1926, 1^{re} série, 141-162.
122. MAGROU (J.). — Recherches anatomiques et bactériologiques sur le cancer des plantes. Masson, 1927, p. 229.
123. MAGROU (J.). — Remarques sur la bactériologie et l'anatomie du crown-gall. *Rev. Path. Vég. et Entom. Agric.*, 1927, **14**, 45.
124. MAGROU (J.). — Le cancer des plantes. *Le Cancer*, Bruxelles, 1928, **5**, 28.
125. MAGROU (J.). — Sur l'action à distance du *Bacterium tumefaciens*. *Rev. Path. vég. et Entom. Agric.*, 1929, **16**, 69.
126. MAGROU (J.) et MAGROU M^{me} M.). — Radiations émises par le *Bacterium tumefaciens*. *Rev. Path. vég. et Entom. Agric.*, 1927, **14**, 244.
127. MAQUENNE (L.). — Les sucres et leurs principaux dérivés. Gauthier-Villars, Paris, 1900.
128. MARTENS (R.). — Considérations sur le dosage séparé des acides

- aminés et des polypeptides dans les produits de digestion des protéines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 454.
129. MARTENS (R.). — Contribution à l'étude de l'azote peptidique dans le sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, **10**, 1336.
130. MAY (O. E.), HERRICK (H. T.), THOM (C.) et CHURCH (M. B.). — The production of gluconic acid by the penicillium luteum-purpurogenum group. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, **75**, 417.
131. MOLLIARD (M.). — Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Ac. Sc.*, 1922, **174**, 881.
132. MOLLIEUX (P.). — Recherches biochimiques sur la nutrition azotée du *Bacillus jæcalis alcaligenes*. *Th. Doct. Univ.*, Paris, 1932.
133. MOREL (A.). — Précis de technique chimique à l'usage des laboratoires médicaux. Doin, Paris, 1909.
134. MOTTE (J.). — La tumeur à *Bacterium tumefaciens* et le cancer. *Th. Doct. Méd.*, Montpellier, 1930.
135. MUNCIE (J. H.). — The effect of crown gall on young apple and peach trees and longevity of *Bact. tumefaciens*, in the soil. *Phytopath.*, 1926, **16**, 79 (abstracts).
136. MUNCIE (J. H.) et PATEL (M. K.). — Studies upon a bacteriophage species for *Pseudomonas tumefaciens*. *Phytopath.*, 1930, **20**, 289.
137. NEINEC (A.). — Bakterielle Wuchsstoffe. *Ber. deut. bot. Ges.*, 1930, **48**, 72.
138. NICOLLE (M.) et ALLILAIRE (E.). — Note sur la production en grand des corps bactériens et sur leur composition chimique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1909, **23**, 547.
139. ONSLOW (M. W.). — Practical Plant biochemistry. 2^e édit., Cambridge, University Press, 1923.
140. OSSART (M^{lle} E.). — Contribution à l'étude de la production d'acétone par les bactéries. Recherches biochimiques sur deux espèces aérobies. *Th. Doct. Univ.*, Paris, 1924.
141. PATEL (M. K.). — An improved method of isolating *Pseudomonas tumefaciens* Sm. and Town. *Phytopath.*, 1926, **16**, 577.
142. PATEL (M. K.). — Strains of *Pseudomonas tumefaciens*. *Phytopath.*, 1927, **17**, 46 (Abstract).
143. PATEL (M. K.). — Longevity of *Pseudomonas tumefaciens* Sm. and Town. in various soils. *Phytopath.*, 1928, **18**, 129.
144. PATEL (M. K.). — The use of sodium taurocholate and crystal violet in the isolation of *Bact. tumefaciens* Sm. and Town. *Proc. Iowa Acad. Sc.*, 1927, **34**, 88.
145. PATEL (M. K.). — A study of pathogenic and non-pathogenic strains of *Pseudomonas tumefaciens*. *Phytopath.*, 1928, **18**, 331.
146. PEIRIER (J. C.) et NGUYEN KIM KIN. — Dosage rapide des acides

- aminés et des polypeptides dans le nuoc-mam. *Ann. Falsific. et Fraudes*, 1933, **26**, 6.
147. PEKLO. — Ueber die Smith'schen Rubentumoren. *Zeit. f. Zuckerindustrie in Böhmen*, 1915, **39**, 204.
148. PEKLO. — Zaklady o vyzivě rostlin. *Brno*, 1923.
149. PINOY (E.). — A propos du cancer des plantes ou crown gall. *C. R. Ac. Sc.*, 1925, **180**, 311.
150. PLIMMER (R. H. A.). — The chemical constitution of the proteins. Part. I : Analysis. Longmans Green and Co, London, 1917.
151. PREVOT (A. R.). — Études de systématique bactérienne. I. Lois générales. II. Cocci anaérobies. *Th. Doct. Univ. (Sciences)*, Paris, 1933.
152. QUIRK (A. J.) et FAWRETT (E. H.). — Hydrogen ion concentration VS. Titratable acidity in culture mediums. *Journ. of Infect. Dis.*, 1923, **33**, 1-59.
153. RAISTRICK (H.) et SIMONART (P.). — Studies in the biochemistry of micro-organisms. 2.5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid) a new product of the metabolism of glucose by *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Biochem. Journ.*, 1933, **27**, 628.
154. REDDICK, DONALD et STEWART (V. B.). — Crown gall of apple and peach with notes on the biology of *bact. tumefaciens*. *Cornell Univ. Agr. Exp. Stat. Mem.*, 1924, **73**, 19.
155. REICHERT (F.). — Ueber bazillogenen Tumoren und tumor erzeugende Bakterien. *Deut. med. Woch.*, 1925, 1306. Ueber die Tumorerzeugende Bakterien. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1925, **22**, 446.
156. RIKER (A. J.). — Studies of crown gall. *Phytopath.*, 1922, **12**, 55.
157. RIKER (A. J.). — Some relations of the crown gall organism to its host tissue. *Journ. of Agric. Res.*, 1923, **25**, 119.
158. RIKER (A. J.). — Studies on the influence of some environmental factors on the development of crown-gall. *Journ. of Agric. Res.*, 1926, **32**, 83.
159. RIKER (A. J.), BANFIELD (W. M.) et KEITT (G. W.). — The relation of certain bacteria to the development of roots. *Phytopath.*, 1929, **19**, 107.
160. RIKER (A. J.), BANFIELD (W. M.), WRIGHT (W. H.), KEIT (G. W.) et SAGEN (H. C.). — Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *Journ. of Agric. Res.*, 1930, **41**, 507.
161. ROGER (H.). — Note sur la recherche de l'acide glycuronique dans l'urine. *C. R. Soc. Biol.*, 1915, **78**, 714.
162. SAGEN (H. E.), WRIGHT (W. H.) et RIKER (A. J.). — The cultural differentiation of *B. radiobacter* Beij and closely related organisms. *Journ. of Bact.*, 1929, **17**, 22.

163. SCHATZEL (K.). — Beiträge zur morphologie und physiologie des bakteriellen pflanzenkrebseregers. *Phytopath. Ztschr.*, 1932, **5**, 251.
164. SCHÖEN (M.). — Problèmes de spécificité dans les processus de fermentation. *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, **47**, 690.
165. SCHÖEN (M.). — Le problème des fermentations. Masson, Paris, 1926.
166. SELBY (A. D.). — Preliminary report upon diseases of the peach. *O. Agr. Exp. Stat. Bull.*, 1898, **92**, 208.
167. SIEGLER (E. A.). — a) Studies on the etiology of apple crown-gall. *Journ. of Agric. Res.*, 1928, **37**, 301.
b) The woolly-knot type of crown-gall. *Journ. of Agric. Res.*, 1929, **39**, 427.
168. SIMON (L. J.). — Action des amines aromatiques primaires sur quelques composés cétoniques dissymétriques. *Th. Doct. ès-Sc.*, Paris, 1895.
169. SMITH (E. F.). — Crown-gall of plants. *Phytopath. Offic. organ. of the amer. Phytopath. Soc.*, 1911, **1**, 7.
170. SMITH (E. F.). — Crowngall and sarcoma. *U. S. Dept. Agric. B. P.*, 1911, **1**, 85.
171. SMITH (E. F.). — On some resemblances of crown-gall to human cancer. *Science*, 1912, **35**, 161.
172. SMITH (E. F.). — Cancer in plants. *Proc. Intern. Congr. Med. Sec. III. Cent. Path.*, 1913, **17**, 281.
173. SMITH (E. F.). — Crowngall of plants and cancer. *Science*, 1916, **43**, 348.
174. SMITH (E. F.). — Studies on the crown-gall of plants. Its relation to human cancer. *Journ. of Cancer Res.*, 1916, **1**, 231.
175. SMITH (E. F.). — Embryomas in plants produced by bacterial inoculations. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 1917, **28**, 277.
176. SMITH (E. F.). — Chemically induced crowngalls. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1917, **3**, 312.
177. SMITH (E. F.). — Mechanism of tumor growth in crowngall. *Journ. of Agric. Res.*, 1917, **8**, 165.
178. SMITH (E. F.). — Mechanism of overgrowth in plants. *Proc. amer. Philos. Soc.*, 1917, **56**, 437.
179. SMITH (E. F.). — Production of tumors in the absence of parasites. *Arch. of Dermat. and syphilis*, 1920, **2**, 176.
180. SMITH (E. F.). — An introduction of Bacterial diseases of plants. Philadelphia and London, W. B. Saunders Co, 1920.
181. SMITH (E. F.). — a) Appositional growth in crown-gall tumors and in cancers. *Journ. of Cancer Res.*, 1922, **7**, 1.
b) Twentieth Century advances in cancer research. *Journ. of Radiol.*, 1923, **4**, 295.

182. SMITH (E. F.). — Le crown-gall. *Rev. Path. végét. et Entom. Agric.*, 1924, 11.
183. SMITH (E. F.) et TOWNSEND (C. O.). — A plant tumor of bacterial origin. *Science*, 1907, 25, 671.
184. SMITH (E. F.) et TOWNSEND (C. O.). — Ein Pflanzentumor bakteriellen Ursprungs. *Centr. f. Bakt.*, 1907, 20, 89.
185. SMITH (E. F.), BROWN (N. A.) et TOWNSEND (C. O.). — Crown-gall of plants : its cause and remedy. *U. S. Depart. Agric. Bureau of Plant Indust. Bull.*, 1911, p. 213.
186. SMITH (C. O.). — Further proof of the cause and infectiousness of crown-gall. *Univ. Calif. Agric. Exp. Stat. Bull.*, 1912, pp. 235, 531.
187. SMITH (C. O.). — Some successful inoculations with the peach crown-gall organism and certain observations upon retarded gall formation. *Phytopath.*, 1913, 3, 59.
188. SMITH (C. O.). — Crown-gall or plant cancer. *Bull. State Cam. Hort.* (California), 1916, 5, 201.
189. SMITH (C. O.). — Crown-gall and cancer. *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 1916, 67, 1318.
190. SORANER (P.). — Die Bakteriosen der Vitaceen. *Handb. d. Pflanzenkrank.*, 1908, 2, 57.
191. SORENSEN (S. P. L.). — Études enzymatiques. I. Sur la mesure quantitative des scissions protéolytiques « Titration du formol ». *C. R. Trav. du Labor. de Carlsberg*, 1907, 7.
192. STAPP (C.). — Der bakterielle pflanzenkrebs und seine beziehungen zum tierischen und menschlichen Krebs. *Ber. deut. bot. Ges.*, 1927, 45, 480.
193. TEUTSCHLAENDER et KRONENBERGER (F.). — Ueber Versuche mit *B. tumefaciens*. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1926, 23, 177.
194. TINOZZI (F. P.). — Beitrag zum Studium der Blutveränderungen bei ratten mit experimental tumoren. *Ztschr. f. Krebsf.*, 1925, 22, 540.
195. TOUMEY (J. W.). — An inquiry into the cause and nature of crown-gall. *Ar. Ag. Exp. Sta. Bull.*, 1903, 33, 7-64.
196. TOWNSEND (C. O.). — A bacterial gall of the daisy and its relation to gall formations on other plants. *Science*, 1909, 29, 273.
- 197 a. VALLE-MIRANDA (F. G.). — Contribution à l'étude du *Proteus vulgaris* HAUSER (Recherches biochimiques comparées sur une race pathogène et saprophyte). *Th. Doct. Univ.*, Paris, 1917.
- 197 b. VINCENT et DELACHANAL. — Préparation biologique du lévulose au moyen de la mannite. *C. R. Ac. Sc.*, 1897, 125, 716.
198. VIOLE (H.). — Les microbes du groupe *B. coli-lactis aerogenes*. *Presse Médicale*, janvier 1923, p. 70.
199. VOISENET (E.). — a) Sur la recherche de l'hexaméthylène-tétra-

- mine dans les moûts et les vins. *C. R. Ac. Sc.*, 1910, **150**, 879.
- b) Sur une nouvelle réaction colorée de l'acroléine. *Journ. Pharm. Chim.*, 1910, **2**, 214.
200. VOISENET (E.). — Étude du *Bacillus amaracrylus*, agent de déshydratation de la glycérine. *Th. Doct. ès Sc.*, 1917.
201. WRIGHT (W. H.), HENDRICKSON (A. A.) et RIKER (A. J.). — Studies on the progeny of single-cell isolation from the hairy-root and crown-gall organisms. *Journ. of Agric. Res.*, 1930, **41**, 541.
202. WRIGHT (W. H.), RIKER (A. J.) et SAGEN (H. E.). — Studies on the differentiation of the crown-gall type of bacteria from non-pathogenic bacteria of the radiobacter group. *Phytopath.*, 1929, **19**, 98.
203. WRIGHT (W. H.), RIKER (A. J.), SAGEN (H. E.) et BANFIELD (W. M.). — Studies on the bacteriological differentiation of the crown-gall and hairy-root types of bacteria. *Phytopath.*, 1929, **19**, 97.
-

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Les théories modernes proposées pour expliquer la
fermentation alcoolique.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 22 juin 1934.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

